



UNIVERSITA' DI PISA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

**Variabili in grado di influenzare la valutazione del BALF:
valutazione della ripetibilità nella lettura del WBC e della
quantità di muco nel BALF**

Candidato: Giacchi Andrea

Relatori:

Dott.ssa Micaela Sgorbini

Dott.ssa Francesca Bonelli

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

A Mio Cugino Titta

INDICE

RIASSUNTO / ABSTRACT	Pag.4
1 Introduzione	Pag.5
1.1 Storia	Pag.6
2 Lavaggio bronco-alveolare	Pag.7
2.1 Sedazione	Pag.10
2.2 Tecnica alla cieca	Pag.11
2.3 Tecnica endoscopica	Pag.12
2.4 Complicazioni	Pag.14
3 Raccolta e conservazione del BALF	Pag.15
4 Allestimento del preparato citologico	Pag.17
5 Valutazione macroscopica del preparato citologico	Pag.20
5.1 Muco	“
5.2 Colore	Pag.21
5.3 Odore	“
6 Conta cellulare totale	Pag.22
7 Conta cellulare differenziale	Pag.24
8 Elementi cellulari e non cellulari presenti nel BALF	Pag.26
8.1 Cellule infiammatorie	“
8.2 Muco e sua quantificazione	Pag.28
8.3 Cellule epiteliali	Pag.37
8.4 Materiale estraneo dell'apparato respiratorio	Pag.38
9 Fattori che influenzano la conta cellulare totale e la conta cellulare differenziale	Pag.39
10 Parte sperimentale	Pag.42
10.1 Introduzione	Pag.44
10.2 Materiali e metodi	“
10.2.1 Gestione delle cavalle	Pag.45
10.2.2 Criteri di inclusione	“
10.3 Analisi statistica	Pag.47
10.4 Risultati	Pag.49
10.5 Discussioni e conclusioni	Pag.50
11 Conclusioni generali	Pag.52
12 Bibliografia	Pag.54
RINGRAZIAMENTI	Pag.67

RIASSUNTO

INTRODUZIONE. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare: 1) ripetibilità della lettura dei WBC del BALF mediante contaglobuli e della densità ottica del muco tracheale valutato mediante spettrofotometria; 2) correlazione tra torbidità del BALF e punteggio del muco tracheale.

MATERIALI E METODI. Il BAL è stato eseguito su 41 fattrici di razza trotatore sane di età compresa tra i 2 e i 10 anni. Il muco tracheale è stato quantificato mediante un punteggio proposto da altri autori (Gerber et al., 2004). Per valutare la ripetibilità della lettura dei WBC al contacellule, il BALF è stato letto per 10 volte consecutivamente. Lo stesso è stato fatto per valutare la ripetibilità della lettura della torbidità del muco tracheale. La distribuzione dei dati ottenuti è stata verificata mediante il Shapiro-Wilk normality test. Poiché la distribuzione dei dati è risultata normale, è stata effettuata l'analisi della varianza a una via (ANOVA) per misure ripetute e il Tukey's Multiple Comparison test come *post hoc* sulle 10 valutazioni dei WBC totali e delle DO, al fine di verificare eventuali differenze. È stata calcolata la media delle 10 DO, quindi è stata verificata la correlazione tra la media delle DO per ogni cavallo e il punteggio del muco tracheale mediante test di Pearson. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0,05$.

RISULTATI. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra le letture dei WBC e la valutazione della DO. La correlazione tra la media delle DO e il punteggio del muco tracheale è risultata positiva e significativa ($r: 0,4$; $p < 0,05$) è stata osservata per la DO *vs* il punteggio del muco.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI. I nostri risultati confermano la ripetibilità della valutazione del WBC mediante contacellule e della valutazione della torbidità del muco tracheale mediante spettrofotometria. I nostri risultati supportano anche l'utilità della misurazione oggettiva della torbidità del BAL allo spettrofotometro per la quantificazione del muco, perché evidenziano una correlazione positiva tra DO e *mucus score* tracheale. Nella nostra indagine all'aumentare del muco tracheale incrementa la DO del BAL. I nostri risultati concordano con le osservazioni di altri autori i quali hanno evidenziato una correlazione positiva tra la quantità di muco tracheale e bronchiale. In conclusione, la valutazione della torbidità del liquido refluo potrebbe essere un valido aiuto nella valutazione quali-quantitativa del BALF anche in relazione al fatto che è di rapida esecuzione e di bassissimo costo.

Parole chiave. Cavallo, BAL, conta cellulare totale, quantificazione del muco

ABSTRACT

AIM. To evaluate: 1) repeatability in BALF WBC count; 2) turbidity evaluation of BALF for mucus quantification.

MATERIALS AND METHODS. BAL was performed in 41 healthy trotter mare aged 2-10 years. Tracheal mucus was quantified by a scoring system (0-5). BALF was evaluated 10 times consecutively by a cell counter for WBC and by a spectrophotometer for turbidity (DO). Data distribution was evaluated, both for WBC and DO, by Shapiro-Wilk normality test. ANOVA test and Tukey's Multiple Comparison test as *post hoc* were performed to verify differences between the 10 evaluations, both for WBC and DO. Finally, average of the 10 DO was calculated and a correlation was verify between DO average and mucus score by Pearson test. Statistical differences were set at $p < 0.05$.

RESULTS. No statistical differences were obtained for ANOVA test, while a statistical significative correlation ($r: 0,4$, $p < 0,05$) was obtained for DO *vs* mucus score.

DISCUSSION AND CONCLUSION. Our results confirm the repeatability of WBC evaluation by a cell counter and the useful of turbidity evaluation of BALF with a spectrophotometer for mucus quantification.

Key words. Horse, BAL, total cell count, mucus quantification.

1 INTRODUZIONE

La broncoscopia è un esame collaterale indispensabile per completare la valutazione clinica delle malattie delle vie respiratorie. Nel cavallo atleta assume particolare importanza perché taluni soggetti sono affetti da malattie delle basse vie respiratorie, paucisintomatiche a riposo, che sono responsabili di riduzioni consistenti del rendimento sportivo. L'esame endoscopico in questi casi fornisce indicazioni sullo stato della mucosa tracheale, bronchiale e sulla quantità di secreto attraverso la visualizzazione diretta e permette con il BAL e TW di raccogliere materiale utile per l'esame citologico e batteriologico.

Nelle ultime due decadi sono stati pubblicati numerosi studi che hanno avuto come scopo quello di standardizzare a) le manovre tecniche del prelievo, b) le modalità di conservazione del campione, c) la conta totale delle cellule nucleate, d) l'allestimento dei preparati e le colorazioni da utilizzare, e) l'interpretazione del quadro citologico. Allo stato attuale delle cose, sebbene lo stato dell'arte di questa pratica abbia raggiunto un ottimo livello, esistono relative discordie proprio sull'interpretazione del quadro citologico dei soggetti sani e scarsa univocità sul nome da attribuire sui vari pattern cellulari osservabili nelle tre principali forme di malattie delle basse vie respiratorie.

Lo scopo di questa dissertazione è quello di analizzare le variabili in grado di influenzare la valutazione del liquido refluo del lavaggio broncoalveolare (BALF) e valutarne alcune, quali la ripetibilità nella lettura dei WBC e nella quantificazione del muco.

1.1 Storia

Lo sviluppo delle tecniche diagnostiche in medicina equina ha seguito l'evoluzione della medicina umana. In passato nell'uomo la valutazione delle forme infiammatorie dell'apparato respiratorio erano valutate attraverso l'analisi di campioni di *sputum*, aspirati tracheali, citologia ad ago sottile e biopsie polmonari. Allo stesso modo, la diagnosi delle malattie respiratorie del cavallo si basava soprattutto sulle analisi degli aspirati tracheali e raramente sulle biopsie polmonari.

L'aspirato tracheale è un'indagine collaterale usata soprattutto negli anni '70-'80 per la raccolta di campioni da utilizzare per le analisi citologiche e batteriologiche.

In questi anni sono stati pubblicati articoli in cui vengono riportati valori di riferimento per la citologia relativa sia a soggetti sani che malati (Mansmann e Knight, 1972; Beech, 1975).

Con l'avvento degli endoscopi flessibili, grazie al dr. Ikeda nel 1968, si è verificato un cambiamento sostanziale nelle possibilità diagnostiche in campo umano e di conseguenza anche in medicina veterinaria. Sebbene il fibroscopio sia stato inizialmente utilizzato solo per scopi scientifici per lo studio di patologie immunomEDIATE come la sarcoidosi e la fibrosi polmonare idiopatica nell'uomo, presto è risultato ovvio che questa tecnica miniminvasiva potesse essere utilizzata anche in campo clinico per la diagnosi di tutte le patologie infiammatorie dell'apparato respiratorio mediante il lavaggio broncoalveolare (BAL). Quindi con l'endoscopio è divenuto possibile ottenere con una procedura minimamente invasiva campioni che rappresentano specificatamente le basse vie respiratorie. A partire dagli anni '80 anche in medicina equina è stato utilizzato il BAL come indagine collaterale delle vie aeree profonde (Viel, 1980).

2 LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (Broncho-Alveolar Lavage – BAL)

Il campionamento di materiale biologico delle basse vie respiratorie ha come scopo principale quello di poter eseguire un esame citologico e batteriologico sul campione raccolto. Le metodiche più utilizzate per eseguire questo tipo di campionamento sono tre: il lavaggio tracheale (TW) o l'aspirato tracheale (TA), il lavaggio bronco-alveolare (BAL) e la toracocentesi. Tutte queste metodiche possono essere eseguite sia "in campo" che in strutture attrezzate.

L'indicazione clinica per eseguire una di queste tecniche comprende tosse, *poor performance*, presenza di muco o sangue in trachea, epistassi, febbre di origine sconosciuta o possibile dispnea. Sulla base dell'anamnesi ambientale, remota e prossima e dell'esame clinico può essere più indicata una metodica piuttosto di un'altra al fine di poter scegliere quale sia la più corretta per eseguire il campionamento.

L'aspirato tracheale (AT) consente di campionare le secrezioni provenienti dalla trachea, dai bronchi, e da territori polmonari poco più distali, che hanno raggiunto la trachea grazie alla *clearance* mucociliare. L'aspirato tracheale è indicato in caso di sospetta broncopolmonite batterica, pleuropolmonite batterica o di febbre di origine sconosciuta.

Il lavaggio bronco-alveolare (BAL) permette di raccogliere secrezioni da territori polmonari ancor più distali, appunto bronchiolo-alveolari, e di una regione definita del polmone. Il lavaggio bronco-alveolare è indicato in caso di patologie su base infiammatoria (IAD), allergica (RAO) o l'emorragia polmonare da sforzo atletico (EIPH) in cui gran parte del parenchima polmonare viene coinvolto.

Il BAL è un esame che viene più frequentemente utilizzato per la diagnosi di processi diffusivi o cronici dell'apparato respiratorio. In questi casi, infatti, i campionamenti eseguiti su uno dei due polmoni si possono considerare rappresentativi di entrambi (McGorum et al., 1993a). Sul materiale biologico campionato viene eseguito sempre un esame citologico e in alcuni casi può essere indicato eseguire anche un esame batteriologico.

Il BAL può essere effettuato sia con tecnica endoscopica che "alla cieca".

La tecnica alla cieca è una valida alternativa all'utilizzo dell'endoscopio se non si ritiene necessaria un'attenta visualizzazione delle vie aeree, richiede un supporto tecnico minimo, è a basso costo e facile da effettuare. L'utilizzo dell'endoscopio ha il vantaggio di poter visualizzare le strutture aeree fino alle basse vie e segnalare eventuali alterazioni patologiche correlabili con la patologia respiratoria sospettata (edema, broncospasmo) e la presenza di secrezioni e/o sangue (Hewson e Viel, 2002). Per effettuare il BAL nella maggior parte dei soggetti adulti, è necessario che l'endoscopio sia lungo almeno 160-180 cm. La profondità del polmone lavato dipenderà dal diametro esterno dello strumento. In quasi tutti i soggetti adulti, un diametro esterno di 10-13 mm garantirà il lavaggio dei bronchi di III-VI grado, ciò permette il recupero di cellule provenienti da un ampio numero di bronchioli ed alveoli (Hewson e Viel, 2002). Al contrario, l'uso di uno strumento o di un catetere con un diametro inferiore consente il lavaggio di un numero ridotto di bronchioli ed alveoli, poiché vengono raggiunti i bronchioli più profondi e periferici.

Rispetto alla metodica alla cieca, l'endoscopio permette anche la visualizzazione delle vie aeree. La presenza di anomalie anatomiche o l'accumulo di secrezioni, muco, pus o sangue, possono così essere registrati e possono essere descritti: la localizzazione, la quantità e le caratteristiche. Inoltre se si sospetta la presenza di uno o più ascessi si dovrebbero poter identificare i bronchi dai quali fuoriesce il materiale purulento al fine di poterne effettuare un campionamento. Può essere esaminato attentamente il naso-faringe e la trachea dovrebbe essere ispezionata per l'iperemia e per la qualità delle secrezioni. Inoltre, nel caso di ascessi polmonari è possibile identificare i bronchi dai quali fuoriesce il materiale purulento al fine di poter effettuare un campionamento mirato. La trachea dovrebbe essere ispezionata per l'iperemia e per la qualità delle secrezioni. (Hewson e Viel, 2002).

In un recente lavoro è stato proposto un punteggio per valutare quantitativamente il muco presente in trachea (Holcombe et al., 2001; Gerber et al., 2004). Gli autori danno un punteggio uguale a 0 se non è presente muco; 1 se sono presenti singole gocce di muco; 2 se sono presenti molte bolle, a volte confluenti; 3 se il muco è confluyente ventralmente; 4 se è presente molto muco nella porzione ventrale della trachea; 5 se il muco occupa il 25% e oltre della trachea.

Dovrebbero essere segnalate raccolte di secrezioni diverse dal muco, registrata la loro localizzazione (terzo superiore, medio o inferiore della trachea), la quantità, il colore e le caratteristiche. A causa della depressione della trachea che si localizza a

livello dell'ingresso in torace della trachea, spesso le secrezioni possono essere visualizzate soltanto a questo livello, ma nei casi gravi possono essere evidenziate lungo il decorso di tutta la trachea. Anche la presenza di sangue dovrebbe essere registrata e quantificata mediante un punteggio (Marlin, 2003).

La presenza di edema dovrebbe essere quantificata valutando lo spessore della biforcazione tracheale e della divisione dei grossi bronchi che appariranno ispessiti e arrotondati. Il broncospasmo può essere valutato durante l'esame broncoscopico ed è caratterizzato dalla protrusione degli anelli tracheali nel lume delle vie aeree con conseguente riduzione del diametro delle vie aeree.

Naturalmente, poiché la valutazione endoscopica delle vie aeree è un esame soggettivo, dovrebbe essere effettuato da un operatore esperto. Per questo motivo sono stati sviluppati dei sistemi semi-quantitativi a punteggio per standardizzare i rilievi ottenuti (Hare et al., 1994; Hare e Viel, 1998).

E' importante anche ricordare che l'utilità del BAL è in relazione al fatto che con esso si indagano patologie diffuse a tutto il polmone e non localizzate come ad esempio un ascesso. Inoltre la comparazione tra l'esame citologico del polmone sinistro e destro aveva evidenziato che non esisteva differenza tra l'uno e l'altro (McGorum et al., 1993a). Tuttavia, studi molto recenti hanno dimostrato che il BAL eseguito in un polmone non è rappresentativo di quello eseguito nell'altro polmone dello stesso cavallo, per cui entrambi i polmoni dovrebbero essere campionati per una migliore valutazione della cellularità polmonare e per una precisa diagnosi di malattie delle vie aeree inferiori (Depecker et al., 2014). In alcuni casi è necessario lavare particolari siti polmonari, come ad esempio i settori cranio-ventrali se sospettiamo una polmonite *ab ingestis* o i settori caudo-dorsali se si sospetta una EIPH.

Al fine di ampliare la valutazione delle vie aeree profonde può essere utile ricorrere nella stessa seduta alla raccolta sia del BAL che del TW per la valutazione citologica delle vie profonde e per l'esecuzione dell'esame batteriologico.

2.1 Sedazione

Il BAL viene effettuato in stazione quadrupedale su un animale sedato. La sedazione viene ottenuta mediante somministrazione di $\alpha 2$ -agonisti come xilazina cloridrato (0,3-0,5 mg/kg, IV) o detomidina (0,03-0,05 mg/kg, IV). La concomitante somministrazione di butorfanolo tartarato (0,01-0,03 mg/kg pc, IV) è spesso utile in soggetti con COPD grave ed ipersensibilità marcata, al fine di ridurre gli accessi di tosse secondari al passaggio dell'endoscopio. Viene raccomandato anche l'utilizzo di un torcinaso, particolarmente durante il passaggio dell'endoscopio nel naso-faringe.

2.2 Tecnica alla cieca (figura 1)

(Fogarty, 1990; McKane e Rose, 1993; Taylor e Hillyer, 1997; Hoffman e Viel, 1997; Hodgson e Hodgson, 2003; Roy e Lavoie, 2003; Rush e Mair, 2004).

Per questa metodica viene utilizzato un tubo naso-tracheale flessibile e cuffiato con diametro esterno di 9 mm che fornisce risultati simili a quelli ottenuti con l'endoscopio.

Il tubo viene fatto passare attraverso il naso-faringe estendendo la testa del cavallo, in modo da far passare facilmente il tubo attraverso il laringe in trachea. Un colpo di tosse suggerisce che il tubo è arrivato alla biforcazione tracheale e quindi ha stimolato i recettori della tosse; anche in questo caso viene iniettata lidocaina allo 0,4% (60-120 ml). Quindi il tubo viene fatto avanzare finché non si avverte una resistenza che indica che il diametro esterno del tubo è equivalente al diametro del bronco. Nella maggior parte dei casi, il tubo procede naturalmente nelle zone caudo-dorsali. La cuffia viene insufflata con 5-10 ml di aria; questa previene la fuoriuscita del liquido iniettato. Come per la tecnica endoscopica, vengono infusi 200-300 ml (max 500 ml) di soluzione salina sterile riscaldata utilizzando 5 siringhe da 60 ml. Si dovrebbero instillare 120 ml di soluzione fisiologica, quindi aspirare, instillare la seconda aliquota di 120 ml ed infine aspirare. Le aliquote vengono poi miscelate per costituire un unico campione.

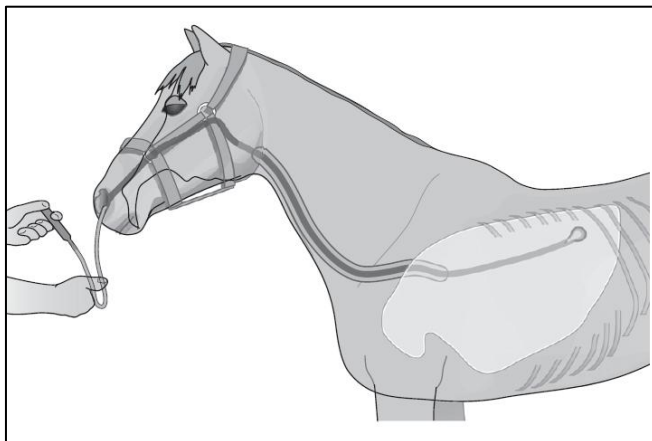


Figura 1 - Tecnica alla cieca (da Hodgson e Hodgson, 2007).

2.3 Tecnica endoscopica

(Taylor e Hillyer, 1997; Hoffman e Viel, 1997; Viel e Hewson, 2003; Roy e Lavoie, 2003; Rush e Mair, 2004)

Dopo aver applicato un torcinaso ed aver pulito le narici da eventuale materiale organico contaminante si fa passare l'endoscopio attraverso il meato ventrale della narice destra o sinistra, si oltrepassa il laringe e si entra in trachea. Quindi si fa passare un catetere (7-8 F per colonscopio) nel canale di servizio dell'endoscopio. Il catetere viene inserito in questo momento perché quando si raggiunge il laringe e si entra in trachea, è possibile avere qualche colpo di tosse. Di solito un soggetto sano tossisce 2-3 volte durante il passaggio dell'endoscopio in laringe, e in ogni caso il riflesso si attenua dopo 5-10 secondi. Al contrario soggetti affetti da RAO, in modo particolare, ma anche soggetti con infiammazione alle vie respiratorie (IAD) possono presentare accessi di tosse più prolungati. In questo caso, attraverso il catetere precedentemente posizionato, è possibile iniettare lidocaina per uso locale (lidocaina senza adrenalina diluita allo 0.4% in soluzione fisiologica sterile); il riflesso tussigeno viene così attenuato e nell'arco di pochi secondi (30 secondi circa) è possibile proseguire con l'introduzione dell'endoscopio. Alcuni Autori (Hewson e Viel, 2002) sconsigliano l'uso di anestetico locale a livello della giunzione laringo-tracheale perché il liquido potrebbe fluire attraverso la trachea e lavare le basse vie prima che si sia raccolto il campione per la batteriologia o per la citologia.

Quindi si percorre la trachea sino alla biforcazione, si entra (dx o sx) e si segue l'albero bronchiale finché il diametro dell'endoscopio lo permette. Anche a questo livello, poiché l'attraversamento della biforcazione tracheale può provocare tosse, è opportuno infondere anestetico topico (lidocaina senza adrenalina diluita allo 0,4% in soluzione sterile). L'endoscopio viene fatto procedere fino ad un bronco segmentale: lo strumento deve essere inserito finché non si avverte una resistenza che indica che il diametro esterno dell'endoscopio è uguale al diametro del bronco. Questo è molto importante perché è necessario che l'endoscopio stesso occluda il bronco per evitare che il fluido instillato venga disperso. Bisogna ricordare che l'area di polmone che viene lavata e quindi indagata è in relazione al diametro esterno dell'endoscopio; strumenti di diametro di 10-13 mm generalmente riescono ad occludere bronchi di IV o VI generazione. In questo caso saremo in grado di lavare un numero significativo di bronchi ad alveoli (Hewson e Viel, 2002).

Una volta che l'endoscopio o il tubo sono posizionati, si può procedere al BAL. Questo viene effettuato con soluzione fisiologica 0.9%, a 37°C per evitare il broncospasmo indotto dall'uso di soluzione a temperatura più bassa. Il fluido può essere instillato direttamente attraverso il canale di servizio dell'endoscopio oppure è possibile utilizzare un catetere che viene fatto passare nel canale di servizio dello strumento e quindi il liquido passa attraverso il catetere.

Si iniettano 300 ml di soluzione salina sterile a 37°C e si aspira una volta svuotata l'ultima siringa. Data l'elevata capacità di assorbimento dell'albero respiratorio è importante aspirare immediatamente la soluzione fisiologica iniettata perchè altrimenti potrebbe venirne persa una buona quantità. Il recupero del lavaggio bronco-alveolare può essere eseguito manualmente o meccanicamente mediante un aspiratore, fissato ad una pressione tra -5 e -15 cm H₂O. L'uso di una pressione negativa maggiore può causare il collasso del bronco sito di campionamento e quindi un trauma dell'epitelio bronchiolo-alveolare, ne consegue il recupero di un campione di scarso volume ed una sua possibile contaminazione iatrogena con emazie (Sweeney et al., 1994). Il recupero di un campione di scarso volume è più rappresentativo di un lavaggio bronchiale con una maggiore percentuale di linfociti e privo di cellule del tratto alveolare. E' possibile raccogliere fino al 75% della soluzione iniettata, ma in alcuni casi, quali per esempio ostruzione delle vie aeree causate da edema o da broncospasmo vengono recuperate quantità inferiori per la riduzione del lume del bronco durante la fase di aspirazione del campione.

Ai fini della valutazione dell'avvenuto campionamento delle vie alveolari è importante determinare la presenza di schiuma sulla superficie del campione, questo indica la presenza di surfactante alveolare e che quindi la soluzione fisiologica ha raggiunto gli alveoli e verosimilmente raccolto le cellule presenti sull'epitelio alveolare.

2.4 Complicazioni

Il liquido viene raccolto con siringhe da 60 ml, cercando di non applicare una eccessiva pressione negativa; questo è necessario per evitare il collasso delle vie aeree e traumi dell'epitelio che esitano inevitabilmente con contaminazioni iatrogene di eritrociti del BAL.

Il volume di liquido iniettato influenza la conta cellulare totale e differenziale. Un volume ridotto di liquido è generalmente causa di raccolta di cellule dai bronchi ma non dagli alveoli con un aumento della percentuale dei neutrofili. Volumi maggiori di liquido permettono di raccogliere campioni più rappresentativi di cellule alveolari (Sweeney et al., 1994). Allo stato attuale delle conoscenze viene raccomandato l'uso di volumi di 250-500 ml (Robinson, 2001).

Le complicazioni del BAL sono minime. Quarantotto ore dopo la procedura è possibile rilevare una risposta infiammatoria di tipo neutrofilico a livello della porzione di polmone lavato. Questa risposta è però limitata al bronco e segmento di polmone lavato e non coinvolge quelli adiacenti ed il polmone controlaterale (Sweeney et al., 1994). Rialzi modesti della temperatura rettale sono stati osservati entro 24 ore dalla procedura, senza effetti clinici. Nei casi di piressia elevata o persistente associati a sintomi generici quali depressione del sensorio e anoressia deve essere valutata l'ipotesi di disseminazione di una preesistente infezione. Per questo motivo è necessario avvisare i proprietari di monitorare l'appetito, la temperatura rettale e l'eventuale deterioramento della funzionalità respiratoria nelle 24 ore post-lavaggio (Hewson e Viel, 2002).

3 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL BALF

Il BALF deve essere raccolto in provette con EDTA per l'esame citologico e in provette da siero o in tamponi con terreno di trasporto per l'esame batteriologico.

Ad oggi non sono descritte delle linee guida univoche per quanto riguarda i metodi di conservazione di campioni di BALF prima della loro analisi. Una conservazione inadeguata dei campioni porta all'alterazione della vitalità delle cellule e/o ad una proliferazione dei microrganismi presenti e può quindi condizionare l'interpretazione del preparato citologico e dell'esame batteriologico. I fattori che maggiormente determinano tali alterazioni sono il tempo, la temperatura e l'uso di fissativi.

Secondo uno studio eseguito nel 2002 (Pickles et al., 2002a) si evidenzia che le cellule sopravvivono più a lungo a temperature inferiori e quella di refrigerazione è la temperatura ottimale per la conservazione di materiale cellulare. In particolare lo studio conferma che si ha una riduzione della conta totale cellulare in relazione al tempo. La morfologia cellulare, infatti, si degrada dopo 24h a 4°C, dopo 8h a 18°C e dopo 4h a 38°C.

Una possibilità per evitare questi fenomeni di alterazione cellulare è quella di ricorrere a dei fissativi, i quali non devono, però, indurre modificazioni della morfologia cellulare. I fissativi possono essere a base alcolica o a base di formalina. Secondo Pickles et al. (2002a) il fissativo a base di formalina causa un aumento significativo della componente linfocitaria e questo sembra essere dovuto ad un errore di lettura del contaglobuli indotto dal fissativo che modifica l'aspetto delle altre cellule infiammatorie, ed in particolare dei neutrofili, rendendole più piccole e di colore scuro e in definitiva più simili ai linfociti.

Un altro fissativo potrebbe essere l'etanolo al 40% da aggiungere nella proporzione di 1:1 al campione subito dopo il prelievo. Questo fissativo blocca la sovra-crescita batterica, ma è sconsigliato per le alterazioni morfologiche cellulari che questo tipo di fissazione comporta (McGorum et al., 1994; Pickles et al., 2002a).

Anche la presenza di microrganismi nel campione di BALF può essere influenzata dal metodo di conservazione in relazione al tempo e alla temperatura. I campioni di BALF destinati all'esame colturale dovrebbero essere seminati nel più breve tempo possibile. Intervalli di tempo superiori alle 24 ore tra il recupero del BALF e la semina del campione per l'esame batteriologico escludono la possibilità di avere

risultati attendibili. Campioni non refrigerati sono a rischio di una rapida sovracrescita sia di batteri patogeni che di contaminanti, mentre i batteri strettamente anaerobi difficilmente sopravvivono a temperature di refrigerazione. All'aumentare della temperatura si ha una riduzione del tempo necessario per osservare una significativa sovracrescita batterica nel campione raccolto. Infatti, già dopo 8h a 18°C si verifica un aumento del numero di microrganismi nel campione raccolto, mentre a temperatura di refrigerazione (4°C), la sovracrescita non si verifica fino a 24h dalla raccolta (Pickles et al., 2002a). Nel caso in cui sia necessario conservare il campione refrigerato di BALF per un periodo superiore alle 24 h, è preferibile in ogni caso aggiungere un fissativo al fine di preservare la morfologia cellulare e prevenire la crescita batterica.

Oltre la sovracrescita batterica, altre cause che precludono l'attendibilità dell'esame batteriologico sono la disidratazione e l'esposizione ad agenti atmosferici. L'idratazione può essere mantenuta ponendo il campione di BALF su un tampone sterile e conservandolo poi in soluzione salina sterile. Questo tipo di mezzo di trasporto è molto povero di nutrienti e quindi la sovracrescita batterica rimane molto limitata.

Gli agenti atmosferici quali l'ossigeno e la temperatura di refrigerazione sono nocivi per la conservazione, per esempio, di batteri anaerobi stretti. In questo caso è utile conservare il BALF in terreno di trasporto specifici per anaerobi e mantenuto a temperatura ambiente.

E' comunque necessario ricordare che la sovracrescita batterica avviene sempre, anche in misura minore se il campione è conservato refrigerato e/o in terreno di trasporto, quindi questo aspetto deve essere tenuto in considerazione nell'interpretazione dei risultati relativi all'esame batteriologico.

4 ALLESTIMENTO DEL PREPARATO CITOLOGICO

La condizione ideale è che il preparato citologico venga approntato il prima possibile dopo la raccolta del campione di BALF. Il preparato citologico può essere allestito direttamente dal campione di BALF mediante striscio, dopo centrifugazione oppure dopo citocentrifugazione.

Lo striscio allestito direttamente dal BALF è una tecnica di semplice esecuzione e fattibile anche in campo e di basso costo. Come in ematologia, lo striscio si esegue disponendo 5µl di sospensione cellulare su di un vetrino e che successivamente viene strisciata mediante un secondo vetrino posto a 45° rispetto al primo e ai bordi della sospensione stessa. La sospensione cellulare si ottiene dopo centrifugazione del campione di BALF, eliminazione del surnatante e sospensione del tappo di cellule con 1-2 gocce di soluzione fisiologica. La preparazione diretta del campione di BALF presenta alcune problematiche legate alla combinazione di una minor quantità di proteine e di cellule, che possono causare una riduzione della qualità del preparato citologico. Infatti, se si ricorre a questa tecnica o alle tecniche che normalmente si utilizzano per la preparazione di vetrini da campioni ematici, si verifica una distruzione delle cellule presenti nel campione a causa della scarsa quantità di proteine. E' quindi necessario utilizzare metodi che permettano un aumento della cellularità e preservino l'integrità cellulare. Una metodica che permette di concentrare la quantità di cellule senza comprometterne l'integrità è la centrifugazione. Essa si esegue a bassi giri (600-800 minuto) per 5 minuti. Il surnatante deve essere delicatamente rovesciato e le cellule risospese aggiungendo 1 o 2 gocce di soluzione fisiologica, quindi il deposito che rimane al fondo della provetta viene raccolto con una pipetta e viene strisciato su di un vetrino portaoggetto (Zinkl, 2002).

Oggi la metodica più diffusa per allestire un preparato citologico da un campione di BALF è la citocentrifugazione, la quale permette di depositare, su un'area centrale e definita del vetrino, un monostrato cellulare uniforme. Anche se non sono descritti dei protocolli standardizzati, alcuni autori indicano che la centrifugazione debba avvenire a bassa velocità (300 rpm) per 3 minuti, utilizzando una frazione di 100 µl del campione di BALF. La frazione di 100 µl si ottiene dopo centrifugazione a 1300

rpm per 6 minuti del campione di BALF; il surnatante viene rovesciato delicatamente e quindi vengono aggiunti 0.2-0.4 ml di siero equino (Pickles et al., 2002b).

I limiti di questa tecnica sono la difficoltà di applicazione in campo, l'accumulo in un'area limitata di molto muco e detriti cellulari che possono mascherare visivamente soprattutto i linfociti ed alterarne anche la morfologia, falsandone quindi la lettura differenziale (Lapointe et al., 1994).

Mettendo a confronto la citocentrifugazione con l'allestimento mediante striscio direttamente dal BALF, esistono differenze relative alla morfologia cellulare che influiscono sulla valutazione della conta differenziale. La citocentrifugazione permette di avere una qualità del vetrino eccellente e una morfologia cellulare perfettamente conservata, rendendo l'identificazione delle cellule molto facile. Al contrario la qualità dello striscio è inferiore: le cellule appaiono più piccole, di una colorazione più scura e di aspetto tridimensionale, il che rende la loro identificazione più difficile. Il preparato citocentrifugato però porta alla lettura di una percentuale inferiore di linfociti rispetto allo striscio tal quale, mentre i macrofagi risultano in numero più elevato. Alcuni Autori (Mordelet-Dambrine et al., 1984; Fleury-Feith et al., 1987) ritengono che i linfociti abbiano capacità adesive al vetrino portaoggetto inferiori rispetto ai macrofagi e quindi non rimangano adesi al vetrino. Altri Autori, invece, hanno supposto una maggiore lisi dei linfociti durante la centrifugazione (Saltini et al., 1984; Fleury-Feith et al., 1987) legata alla velocità applicata. Quindi Willcox e collaboratori (1988) suggeriscono di applicare alte velocità per brevi periodi di tempo.

D'altro canto la valutazione dei linfociti in un preparato citologico ottenuto con striscio può essere erroneamente sovrastimata a causa dell'aspetto più coartato e scuro che altre linee cellulari assumono durante l'allestimento del preparato e che ne falsano la lettura.

Per quanto riguarda i neutrofili non ci sono differenze significative della loro lettura con entrambe le tecniche. Questo dato indica che l'esame citologico mediante striscio fornisce risultati attendibili e quindi diagnostici in corso di neutrofilia polmonare. Infatti i neutrofili, pur essendo di dimensioni più ridotte e di colore più scuro rispetto a quelli osservabili da un preparato mediante citocentrifugazione, non perdono il tipico aspetto segmentato del nucleo.

Infine, anche gli eosinofili sono facilmente identificabili con entrambe le metodiche, grazie alla presenza dei loro caratteristici granuli.

Esistono diverse metodiche di preparazione di un citologico per ottenere una stima accurata dei linfociti (Saltini et al., 1984; Laviolette et al., 1988; Nicholls e Pirie, 2001). Alcuni Autori consigliano di approntare un preparato con Cytospin ed uno con centrifugazione classica, al fine di confrontare i risultati delle due conte cellulari (Hewson e Viel, 2002).

Ogni preparato citologico deve essere asciugato all'aria il più rapidamente possibile per prevenire le alterazioni nella morfologia cellulare e di seguito colorato.

Sia i preparati ottenuti con Cytospin che quelli ottenuti con centrifugazione classica possono essere colorati con colorazione Romanowsky, Diff-Quick o Romanowsky modificato, Wright-Giemsa, May-Grunwald-Giemsa. Colorazioni particolari da utilizzare sono il Blu di Prussia per l'identificazione degli emosiderofagi, la colorazione di Leishmann e il Blu di Toluidina per i mastociti (Hewson e Viel, 2002; Di Fabio et al., 2003; Leclere et al., 2006), la colorazione di Gram permette di differenziare macrofagi immaturi da linfociti di grosse dimensioni.

In uno studio di Leclere et al. (2006) sono stati messi a confronto la colorazione di Romanowsky rapida (Fast-R), la colorazione automatica con coloranti tipo Romanowsky, il May-Grunwald Giemsa ed il Blu di Toluidina al fine di valutare la metodica migliore per mettere in evidenza la capacità metacromatica dei mastociti. Il Blu di Toluidina è risultato il metodo migliore per il rilievo dei mastociti, ma con l'inconveniente di non poter contare le altre cellule che con questa colorazione non possono essere visualizzate. Il metodo di Romanowsky rapido è risultato inadeguato per la colorazione dei mastociti, mentre il metodo Romanosky in automatico ed il May-Grunwald-Giemsa hanno mostrato pari capacità di mettere in evidenza i granuli metacromatici dei mastociti.

I problemi che si possono verificare durante la fase di colorazione dei vetrini sono legati a una colorazione insufficiente o alla formazione di precipitati. Nel caso di una colorazione insufficiente possono essere osservati i granuli eosinofilici di colore rosso brillante e i nuclei dei leucociti di colore blu invece di viola. La formazione di precipitati, di aspetto sferico o reticolare, può mascherare alcuni dettagli cellulari e renderne difficile il riconoscimento. Questo problema si verifica spesso con l'utilizzo delle colorazioni Diff-Quick e Wright. Le cause possono essere legate a un risciacquo insufficiente del vetrino dopo colorazione o alla evaporazione del colorante (Zinkl, 2002).

5 VALUTAZIONE MACROSCOPICA DEL PREPARATO CITOLOGICO

L'aspetto dei campioni di BALF deve essere valutato per alcune caratteristiche macroscopiche, quali la torbidità come indice della presenza di muco, il colore, l'odore.

5.1 Muco

Nei soggetti sani, il BALF (Bronco Alveolar Lavage Fluid) è chiaro o lievemente torbido e sulla superficie è possibile osservare della schiuma bianca che è costituita dal surfactante prelevato.

L'aumento della torbidità di un campione di BALF è un indice dell'aumentata produzione di muco e di desquamazione cellulare delle vie aeree profonde. La valutazione del contenuto di muco del campione di BALF è tuttavia più accurata se si mette in relazione alla quantità di muco visibile all'esame endoscopico delle vie aeree profonde. In soggetti sani, le vie aeree profonde contengono solo tracce di materiale mucoso o ne sono del tutto prive perché nei cavalli il meccanismo di clearance muco-ciliare è efficiente e l'eliminazione di muco pareggia la sua produzione (Withwell e Greet, 1984).

Se è presente muco visibile all'esame endoscopico è consigliabile l'esecuzione del BAL e la valutazione citologica del fluido refluo per interpretare correttamente il fenomeno. Ad esempio, soggetti con una storia di tosse cronica possono mostrare una produzione di muco abbondante, di aspetto denso e di colore opaco-biancastro, che può dare l'impressione di una bronchite settica. In questi soggetti, la citologia del BALF può confermare un processo settico oppure escluderlo sulla base della presenza di macrofagi attivati circondati da abbondante materiale mucoso e uno scarso numero di batteri, generalmente non patogeni (Beech, 1991).

Una classificazione endoscopica oggettiva della quantità di muco accumulato lungo le vie aeree è stata descritta da diversi Autori mediante l'uso di uno *score* clinico da 0 a 3 (Dixon et al., 1995) o da 0 a 5 secondo Altri (Holcombe et al., 2001; Gerber et al., 2004). La letteratura specialistica a questo proposito non indica come quantificare la presenza del muco nel liquido e sul preparato citologico. Sul preparato

citologico viene colorata la componente proteica del muco e si possono quindi osservare ampie striature di colore rosa-violetto. A volte è possibile osservare anche spirali di colore eosinofilo scuro, chiamate spirali di Curschmann, che rappresentano l'impronta del muco a livello bronchiolare. Generalmente questo tipo di reperto si rileva in soggetti che presentano una prolungata ed eccessiva produzione di muco associata a broncospasmo.

5.2 Colore

Il BALF raccolto in soggetti sani non è colorato, ma in condizioni patologiche può cambiare in base alla presenza di elementi cellulari o sostanze libere. Talvolta il colore può anche indirizzare verso un'ipotesi diagnostica. Un aspetto lattescente del BALF, per l'elevato numero di leucociti è suggestivo di una flogosi settica, mentre i campioni ottenuti da soggetti con EIPH possono essere da rosati a rossi, in base al numero di GR o emoglobina libera presenti nel BALF. In uno studio eseguito da McGorum et al., 2007 si riporta che il campione è francamente rosso quando il numero di emazie è superiore a 13.000 per microlitro. Il materiale flocculento in sospensione è costituito da muco e/o detriti cellulari.

5.3 Odore

Un campione di BALF raccolto da soggetti sani è inodore, mentre un odore putrido può essere associato ad un'infezione di tipo anaerobio o a necrosi del parenchima polmonare (McGorum et al., 2007).

6 CONTA CELLULARE TOTALE

La quantificazione del numero totale di cellule/ μ l è un indice del numero complessivo di cellule presenti in un campione. Tuttavia molti fattori possono influenzare l'accuratezza di questa misurazione e, in particolar modo, da campioni di BALF si può ottenere solo una stima della conta cellulare perchè il lavaggio con soluzione salina determina inevitabilmente una diluizione della cellularità del campione. La diluizione stessa, a sua volta, può variare in base alla quantità di soluzione salina iniettata, a quella recuperata e ancora dalle condizioni delle vie aeree (Sweeney et al., 1994; McGorum et al., 2007).

Sono state tentate strategie per valutare l'entità della diluizione del campione, come la tecnica della concentrazione dell'urea, tuttavia questo valore può aumentare significativamente nel caso di un processo infiammatorio polmonare. Alcuni Autori hanno studiato l'utilizzo della valutazione delle proteine totali (PT) del BALF, ma questo esame non sembra essere di utilità perché la concentrazione delle PT nel liquido refluo è molto bassa (Zinkl, 2002).

Un altro fattore che influenza la conta cellulare è la presenza di muco che imprigiona le cellule. Alcuni Autori hanno proposto la filtrazione del campione di BALF, ma questo accorgimento non sembra migliorare l'accuratezza della lettura perché è possibile avere una sottostima della reale entità delle cellule presenti (Mordelet-Dambrine et al., 1984; Lam et al., 1985; Willcox et al., 1988; Nicholls e Pirie, 2001). La filtrazione, infatti, causa la perdita di specifiche popolazioni cellulari, quali cellule epiteliali, macrofagi e mastociti (Hewson e Viel, 2002).

Un altro fattore da prendere in considerazione sono le dimensioni cellulari che possono essere maggiori rispetto alla calibrazione dello strumento. Per quanto riguarda il BALF, il range di riferimento della conta cellulare è $<10^9$ cellule/ μ l. Le alterazioni della lettura dei WBC totali possono essere ovviate utilizzando una tecnica standardizzata in cui si utilizzi un sito di campionamento costante e si recuperi una percentuale pari al 40-60% della soluzione fisiologica iniettata (Hewson e Viel 2002).

I risultati relativi ai WBC totali devono essere comunque interpretati criticamente, perché lo strumento potrebbe non contare tutti gli elementi cellulari escludendo

quelli di maggiori dimensioni e trascurando tutti quelli intrappolati dal muco (Crystal et al., 1986).

7 CONTA CELLULARE DIFFERENZIALE

La valutazione dell'esame citologico richiede la conoscenza delle cellule normalmente presenti nell'apparato respiratorio e della loro morfologia. Inoltre la determinazione delle proporzioni delle varie popolazioni cellulari consente una corretta interpretazione di eventuali modificazioni patologiche. L'accuratezza dell'interpretazione del preparato citologico varia in base al metodo di raccolta del campione e la tecnica utilizzata per la preparazione del vetrino.

Molti studi hanno evidenziato che esiste una differenza tra le popolazioni cellulari presenti nel TW e nel BAL (Derksen et al., 1989; Hodgson e Hodgson, 2003; Allen et al., 2006).

Nel prelievo tracheale le cellule epiteliali ed i neutrofili sono più rappresentati rispetto al BAL. Le cellule epiteliali respiratorie sono presenti nel TW in misura diversa in relazione al grado di trauma subito dall'epitelio durante la procedura di raccolta; allo stesso modo, i neutrofili sono presenti sempre in percentuale maggiore nel TW rispetto al BAL anche nei soggetti sani (Hewson e Viel, 2002).

Non esiste una correlazione tra la popolazione cellulare del TW con quella del BAL, né con i rilievi istopatologici *post-mortem* (Larson e Busch, 1985; Hodgson e Hodgson, 2003; Allen et al., 2006). Esiste invece una correlazione positiva e statisticamente significativa tra la popolazione cellulare del BAL con i rilievi istopatologici (Fogarty, 1990).

La valutazione citologica del BALF è considerata il metodo più sensibile per la valutazione dello stato infiammatorio delle vie respiratorie profonde. Eccezione a questo sono le broncopolmoniti batteriche dove le cellule presenti nel lavaggio tracheale rappresentano più fedelmente il quadro patologico perché l'endoscopia può non permettere di individuare il bronco distrettuale del parenchima polmonare affetto dall'infezione. Alcuni Autori, infatti, hanno evidenziato che soggetti con pleuropolmonite diagnosticata possono avere anche una citologia negativa al BAL (Rossier et al., 1991).

L'interpretazione dell'esame citologico consiste non solo nel riconoscimento degli elementi cellulari, ma anche nel loro conteggio percentuale. Per questo scopo devono essere contate almeno 200-300 cellule, considerando di osservare il preparato in tutti

i campi perché la distribuzione cellulare potrebbe non essere omogenea, in particolare se presente molto muco con cellule intrappolate (McGorum et al., 2007). L'esame microscopico deve essere eseguito inizialmente a basso ingrandimento (20X) per individuare la presenza di aree disomogenee sul preparato allo scopo di considerare solo quelle rappresentative. Per esempio nel caso di agglomerati di muco che intrappolano le cellule può essere molto difficoltosa la loro identificazione e la conta differenziale. Una volta ottenuta una visione d'insieme del vetrino si procede alla conta cellulare differenziale ad immersione (100X). La lettura del preparato ad immersione permette una migliore identificazione delle caratteristiche morfologiche di ciascuna linea cellulare e la presenza di batteri (Hewson e Viel, 2002).

8 ELEMENTI CELLULARI E NON CELLULARI PRESENTI NEL BALF

8.1 Cellule infiammatorie

Le cellule presenti normalmente nelle porzioni bronco-alveolari sono macrofagi, linfociti, e in minor misura neutrofili, eosinofili e mastociti. La popolazione cellulare rimane qualitativamente la medesima in soggetti sani e malati, ma variano le loro percentuali. I limiti di riferimento approssimativi sono stati identificati da vari Autori (tab. 1).

I macrofagi alveolari sono le cellule prevalenti, circa il 60-70% della quantità totale, nei campioni di TW e di BAL. Essi fagocitano una varietà di elementi come globuli rossi, cellule in apoptosi, emosiderina, pollini e spore fungine (Hoffman, 1999; Hoffman et al., 2003; Viel e Hewson, 2003; Michelotto Jr et al., 2010). Un numero elevato di tali cellule è stato rilevato in cavalli purosangue con tosse cronica (McKane et al., 1993)

I macrofagi multinucleati, noti anche come macrofagi giganti nucleati o cellule giganti, sono il prodotto di due o più macrofagi fusi che vanno a costituire un importante risultato nei processi infiammatori del polmone (Anderson et al., 1999), e potrebbero rappresentare una risposta immunitaria Th2 (Helming e Gordon, 2007). Queste cellule possono essere osservate in piccole quantità in TW e BAL in cavalli senza segni di infiammazione delle vie respiratorie, ma un aumento si osserva in casi di infiammazione cronica (Hodgson e Hodgson, 2007).

I linfociti sono in piccole quantità nel TW rappresentando meno del 10% delle cellule totali (Hoffman et al., 2003; Hodgson e Hodgson, 2007). Essi si trovano in alta concentrazione nel BAL rappresentandone il 30-35% delle cellule totali (Hoffman et al., 2003; Viel e Hewson, 2003). L'interpretazione dell'aumento della percentuale dei linfociti è difficile a causa dell'elevata variazione di BAL nei cavalli normali. Tuttavia, un aumento della percentuale di linfociti è stata riportata in cavalli da corsa con intolleranza all'esercizio fisico e tosse cronica, anche se il significato rimane sconosciuto (Hodgson e Hodgson, 2007).

I neutrofili sono presenti in piccole quantità nelle vie aeree dei cavalli sani, ma dato che queste cellule sono altamente reattive, la percentuale può variare rapidamente. La

migrazione dei neutrofili nel tratto respiratorio può essere osservata appena dopo 5 ore da uno stimolo (Brazil, 2001; Léguillette, 2003). I neutrofili sono presenti in proporzione maggiore nel TW rispetto al BAL, forse per la più alta esposizione delle vie aeree prossimali a *noxae* patogene (Hodgson e Hodgson, 2007). Viene considerata per i cavalli sani una percentuale di neutrofili <20 % nel TA (Hoffman et al., 2003; Hodgson e Hodgson, 2007) e di < 5 % nel BAL (Hoffman et al., 2003; Viel e Hewson, 2003).

Gli eosinofili sono presenti in un numero molto basso (0-1%) nel TW e BAL di cavalli adulti normali (Hodgson e Hodgson, 2007). Un aumento degli eosinofili nel BAL può essere un evento transitorio, infatti è possibile riscontrare una differenza nella percentuale di tali cellule in campioni dello stesso soggetto prelevati a distanza di 24 ore (Viel e Hewson, 2003). Tuttavia, l'iperreattività delle vie respiratorie è stata associata ad un aumento del numero di eosinofili nel BAL nei cavalli giovani da corsa (Hare e Viel, 1998).

I mastociti sono presenti in minima quantità nelle vie aeree e sono più frequenti nel BAL che nel TW. Un aumento della percentuale di mastociti nel BAL è stato correlato con iperreattività delle vie respiratorie nei cavalli con tosse cronica, compromissione della funzionalità polmonare e riduzione delle prestazioni atletiche (Hoffman et al., 1998).

N animali	RAZZA	ETA'	Mac (%)	Linf (%)	PMN (%)	EO (%)	MC (%)	Autori
6	Stb	2.7±1.1	64±5	28±3	4±0.3	1±1	0.3±0.3	Moore, 1995
12	Stb	3.1±0.9	60±5	37±5	2±1	0.03±0.1	0.4±0.4	Hare et al, 1994
6	Stb	3.5±1	68*	32*	0.4*	0.3*	1*	Hare, 1998
11	Tb	3.2±1.2	65±6	28±6	7±3	0	0.2±0.7	Fogarty, 1991
7	Stb/Tb	4.3	40-70%	30-60%	<5%	<0.5%	<2%	Ferrucci et al., 2000
11	-	-	60.1±1.4	36.7±1.6	2.2±0.4	0.03±0.03	0.4±0.1	Viel, 1997 a,b
-	-	-	30-60%	30-70%	<5%	-	-	Moore, 1996
-	-	-	30-60%	30-70%	<5%	Occasionali	Rari	Rush e Mair, 2004

Tabella 1 - Valori ottenuti in soggetti sani.

Legenda – Mac: Macrofagi; Linf: Linfociti; PMN: Neutrofili; EO: Eosinofili; MC: Mast-Cell; Stb: Standardbred; Tb: Thoroughbred; DS: Deviazione Standard; *: dati espressi come valori medi.

8.2 Muco e sua quantificazione

Il materiale che si ottiene dal lavaggio delle basse vie aeree contiene sempre una quantità variabile di muco (Zinkl, 2002). La presenza di muco all'interno del campione di BALF gli conferisce un aspetto torbido e quando questo è presente in quantità maggiori si possono osservare filamenti e flocculi biancastri. Sul preparato citologico viene colorata la componente proteica del muco e si possono quindi osservare ampie striature di colore rosa-violetto. A volte è possibile osservare anche delle spirali di colore scuro, chiamate spirali di Curschmann, che rappresentano lo stampo del muco a livello bronchiolare. Generalmente questo tipo di reperto si trova in soggetti che presentano una prolungata ed eccessiva produzione di muco associata a broncospasmo e ridotta attività mucociliare (Bain, 1997; McGorum et al., 2007).

Il punteggio soggettivo di accumulo di muco tramite l'endoscopio è spesso utilizzato per quantificarne l'accumulo. La standardizzazione della quantificazione del muco, sia tracheale che bronchiale, è stata affrontata da diversi autori. Già a fine anni '80, Dieckmann aveva approntato uno score a 5 punti sia per quanto riguardava la quantità che la viscosità delle secrezioni tracheali (tab. 2).

A	Quantità secrezione	B	Viscosità secrezione
0	Nessun accumulo di secrezione. Nessun flocculo di secrezione.	0	Mucosa umida, soltanto piccole quantità di secrezione acquosa impossibile da aspirare.
1	Nessun accumulo di secrezione. Singoli flocculi di secrezione.	1	Mucosa umida, singoli visibili flocculi nella secrezione acquosa, facilmente aspirabile.
2	Accumulo di secrezione ventralmente. Singoli grandi flocculi di secrezione.	2	Mucosa umida, secrezione sieromucosa localizzata ventralmente, omogenea, facilmente aspirabile.
3	Significativo accumulo di secrezione ventralmente. Abbondanti flocculi di secrezione.	3	Mucosa umida, secrezione sieromucosa con abbondanti isolati flocculi, localizzata ventralmente, facilmente aspirabile.
4	Uniforme accumulo di secrezione ventralmente. Secrezione omogenea.	4	Mucosa umida/appiccicosa, secrezione da mucosa a muco purulenta, pochi flocculi di muco dorsalmente, molto difficile da aspirare.
5	Secrezione che riempie più di un quarto del lume tracheale. Unica quantità di secrezione ("pozza").	5	Mucosa appiccicosa/secca, secrezione purulenta, abbondanti flocculi di muco dorsalmente, qualche formazioni di muco simil-ragnatela molto difficile da aspirare (quasi impossibile).

Tabella 2 - Punteggi della quantità e viscosità delle secrezioni tracheali (Dieckmann et al., 1987).

Dixon e collaboratori (1995) hanno formulato un punteggio da 0 a 3:

- Punteggio 0: secrezioni respiratorie non visibili;
- Punteggio 1: qualche gocce di secrezioni respiratorie;
- Punteggio 2: un piccolo accumulo di secrezioni respiratorie;

- Punteggio 3: un accumulo molto grande (> 20 ml) di secrezioni respiratorie.

Holcombe e collaboratori nel 2001 hanno proposto per il seguente punteggio:

- 0 = muco non visibile;
- 1 = singole piccole gocce;
- 2 = molteplici gocce soltanto parzialmente confluenti;
- 3 = muco confluyente ventralmente;
- 4 = grande “pozza” ventralmente;
- 5 = quantità profusa di muco che occupa più del 25% del lume tracheale.

Riguardo la valutazione del muco, nel 2000 Gerber e collaboratori hanno pubblicato uno studio che le cause fisiopatologiche dell’accumulo di muco nelle vie respiratorie del cavallo. Tale studio considera:

1. le proprietà reologiche del muco:
 - viscoelasticità;
 - capacità di clearance mucociliare, espressa come indice (mucociliary clearability index (MCI);
 - capacità di clearance tosse, espressa come indice (cough clearability index (CCI);
2. il contenuto solido del muco;
3. la citologia del fluido del lavaggio bronco alveolare (BALF).

Questi parametri sono stati messi a confronto tra cavalli affetti da RAO e cavalli di controllo sani, prima e dopo cambiamenti ambientali nelle scuderie con stabulazione in paglia come lettiera e fieno come alimentazione. I campioni di muco sono stati prelevati all’inizio dello studio (0 h), a 6 h, a 24 h e a 48 h dopo i cambiamenti ambientali.

L’eccessivo accumulo di muco è una caratteristica della RAO e può derivare da una abbondante secrezione e/o da una ridotta clearance. Tutte le alterazioni che riguardano l’apparato mucociliare o le proprietà fisiche del muco comportano cambiamenti della clearance mucociliare. In letteratura, nei cavalli affetti da RAO l’importanza di tale clearance è molto discussa. Gli autori Coombs e Webbon (1987), Turgut e Sasse (1989) sostengono che la velocità di clearance mucociliare è diminuita in soggetti con RAO, altri autori, invece, non hanno trovato alcuna

differenza nel confronto con cavalli sani (Willoughby et al., 1991). Secondo alcuni autori (Gerber, 1995; Gerber et al., 1997b) le proprietà del muco giocano un ruolo molto importante.

Con la parola “muco” viene descritta l’entità simil-gel delle secrezioni che sono presenti nelle vie aeree. La sua composizione è eterogenea in quanto costituita da acqua, glicoproteine della mucina e lipidi, così come da cellule con i loro prodotti di degradazione e proteine derivate dal siero. Questa eterogeneità comporta proprietà simil-liquide (viscosità) e simil-solidi (elasticità). Variazioni nelle suddette proprietà di viscoelasticità (King 1979; King et al., 1985; King e Rubin, 1994) determinano cambiamenti nella capacità di clearance mucociliare e clearance tosse. La viscoelasticità del muco viene influenzata da alcuni fattori: l’idratazione, cioè il suo contenuto in solidi e acqua (Shih et al., 1977; App et al., 1993; Tomkiewicz et al., 1993), la presenza di cellule infiammatorie, e in particolare la presenza di DNA di elevato peso molecolare (Armstrong e White 1950; Picot et al., 1978) e filamenti di actina rilasciati durante la degradazione dei neutrofili (Vasconcellos et al., 1994).

Nei cavalli affetti da RAO i neutrofili invadono il polmone già nelle prime 7 ore dal cambiamento ambientale (Fairbairn et al., 1993) e si accumulano nelle vie respiratorie in gran numero (Derksen et al., 1985; McGorum et al., 1993) determinandone allo stesso tempo la loro ostruzione.

Gerber e collaboratori (2000) hanno intrapreso lo studio valutando 14 cavalli, di cui 7 con una precedente diagnosi di RAO (gruppo principale) e 7 senza manifestazione clinica di malattia del tratto respiratorio (gruppo di controllo). I soggetti sono stati mantenuti al pascolo e la loro dieta è stata supplementata con mangime pellettato fino a quando tutti gli animali sono risultati esenti da segni clinici di ostruzione delle vie aeree.

La gravità dell’ostruzione delle vie aeree è stata valutata clinicamente, utilizzando un sistema di punteggio numerico (punteggio clinico, CS) che prevedeva l’esame fisico di ciascun cavallo prima della raccolta del campione. Il sistema di punteggio era costituito da:

- dilatazione delle narici (punteggio da 0 a 2):
 - 0 = nessuno o poco movimento nell’inspirazione;
 - 1 = dilatazione durante l’inspirazione, ritornando normale quando termina l’inspirazione;
 - 2 = dilatazione durante l’inspirazione e l’espiazione.

- movimento addominale (punteggio da 0 a 3):
 - 0 = nessuno o poco movimento nella regione ventrale del fianco;
 - 1 = leggero appiattimento addominale nella regione ventrale del fianco;
 - 2 = ovvio appiattimento addominale e “heave line” che si estende non più della metà della distanza tra l’articolazione del gomito e la tuberosità coxale;
 - 3 = ovvio movimento addominale e “heave line” che si estende oltre la metà della distanza tra l’articolazione del gomito e la tuberosità coxale.

Il punteggio clinico (CS) è stato calcolato eseguendo la somma dei due sopracitati punteggi e tutti gli animali, per poter entrare a far parte dello studio, dovevano avere un $CS \leq 1$ al tempo 0 h; ciò vuol dire che i cavalli affetti da RAO, all’inizio dello studio, erano in fase di remissione clinica. Gli animali del gruppo di controllo, per definizione, dovevano avere un $CS \leq 1$ in tutti i vari momenti di campionamento (0 h, 6 h, 24 h, 48 h).

Il prelievo del muco è stato ottenuto utilizzando un brush da citologia che è stato fatto passare attraverso un endoscopio inserito nella trachea dei soggetti. Dal momento che studi precedenti hanno mostrato differenze nella media delle caratteristiche reologiche (Gerber et al., 1998) tra i campioni di muco prelevati nella parte dorsale e quelli nella parte ventrale della parete tracheale, il campionamento del muco è stato eseguito solamente nella metà ventrale della trachea.

Il BALF è stato realizzato per mezzo di un endoscopio di 3 metri fatto passare attraverso le narici e incuneato in un bronco periferico (Derksen et al., 1989). Sono state così instillate 6 aliquote da 50 ml di soluzione salina fosfato tamponata (PBS) nel tubo e recuperate mediante suzione. I fluidi di lavaggio sono stati mescolati per valutare il volume totale di fluido. La conta cellulare totale è stata ottenuta manualmente utilizzando un emocromocitometro. La conta cellulare differenziale dei linfociti, macrofagi, neutrofili, eosinofili, mastcellule e cellule epiteliali è stata eseguita mediante conta di 100 cellule per campione su vetrini allestiti tramite citocentrifuga e colorati con Diff-Quick.

L’analisi eseguita da Gerber e collaboratori è stata la prima a mettere a confronto le proprietà reologiche del muco di soggetti affetti da RAO e soggetti normali. Tale

analisi, ha mostrato un aumento del punteggio clinico (CS) nei soggetti del gruppo principale dopo 6 h, 24 h, 48 h, mentre nel gruppo di controllo il CS è rimasto ≤ 1 .

La citologia del BALF, durante i cambiamenti ambientali, ha evidenziato nel gruppo principale un incremento maggiore di 3 volte (0 vs. 48 h) della conta cellulare totale (TCC) e maggiore di 4 volte (0 vs. 48 h) della percentuale dei neutrofili. È stata notata una incidenza significativa nel gruppo e nel tempo della TCC e della conta neutrofilica. Tra i gruppi non sono state riportate differenze nei valori basali (0 h) riguardo la TCC e la conta neutrofilica che, inoltre, non sono cambiati nel corso del tempo (0 h vs. 48 h) nel gruppo di controllo. Al contrario, nel gruppo principale la conta cellulare totale e la conta neutrofilica sono aumentate dopo 6 h se paragonate al tempo basale (0 h), e da 6 h a 24 h se confrontate con il gruppo di controllo. In merito alla conta dei linfociti, eosinofili, mastociti, macrofagi e cellule epiteliali non ci furono rilevanze degne di nota o interazioni.

Riguardo la viscoelasticità e la clearance muco ciliare non si sono evidenziate differenze significative tra il gruppo principale e il gruppo di controllo dall'inizio del protocollo (0h) fino a 6 h dopo le modificazioni ambientali, per cui l'autore affermava che probabilmente l'accumulo di secrezioni osservato nei cavalli affetti da RAO in fase di remissione è dovuto anche ad altri fattori, ad esempio l'ipersecrezione. Tuttavia dopo 24 h dai cambiamenti ambientali, la viscoelasticità del muco è risultata significativamente aumentata (più del triplo).

Invece il rapporto di viscoelasticità/elasticità non ha mostrato alcuna differenza tra i due gruppi dopo i cambiamenti ambientali, ciò significa che l'incremento osservato nel gruppo principale è dovuto a cambiamenti proporzionali sia della viscosità che dell'elasticità. Questi risultati suggeriscono che il cambiamento della viscoelasticità del muco nei soggetti affetti da RAO, influenzato significativamente dalle variazioni ambientali, avviene all'esordio dei segni clinici e incide sia sulla clearance mucociliare che sulla clearance tosse e può contribuire all'accumulo e alla stasi del muco nelle vie respiratorie di tali soggetti in fase di esacerbazione acuta.

Anche i cambiamenti degli indici di clearance mucociliare (MCI) e tosse (CCI) sono risultati molto pronunciati dopo 24 h dai cambiamenti ambientali. Dopo un altro giorno in scuderia, i valori sia della viscoelasticità che della clearance mucociliare tendevano a ritornare ai valori basali. Gli elevati valori di viscoelasticità che si sono osservati possono essere un fenomeno transitorio di esacerbazione acuta che avviene dopo la stabulazione di cavalli altamente suscettibili.

L'autore sostiene che altre caratteristiche come la filanza o l'adesività del muco, non presi in esame nel suddetto studio, possono influire significativamente sulla clearance.

L'età può giocare un ruolo nella reologia del muco equino, tuttavia nel presente studio essa non è considerata un fattore statisticamente significativo sia tra il gruppo principale e di controllo, sia all'interno degli stessi gruppi.

Basandosi soltanto sull'apparenza fisica, alcuni autori (Schatzmann et al., 1972) propongono che la viscosità del muco è proporzionale alla gravità dei segni clinici dell'ostruzione delle vie aeree nei cavalli-RAO.

Un recente studio ha indicato valori significativamente elevati della viscosità di muco in cavalli con RAO rispetto a cavalli affetti da malattia infiammatoria delle vie aeree. Gli autori hanno affermato che la differenza è dovuta alla presenza di DNA di alto peso molecolare nel muco di animali affetti da RAO (Pietra et al., 1998).

I dati disponibili sulla reologia del muco respiratorio equino suggeriscono, tuttavia, che alterazioni di tale caratteristica possono essere in funzione dell'intensità e della durata dell'esposizione ad agenti irritanti o allergeni così come la gravità e la durata della malattia delle vie aeree negli individui. Ciò spiegherebbe i risultati contraddittori riportati in studi riguardo la clearance muco ciliare in cavalli affetti da RAO (Coombs e Webbon, 1987; Turgut e Sasse, 1989; Willoughby et al., 1991), dato che la clearance mucociliare può essere normale o compromessa in relazione a fattori individuali e ambientali.

La citologia del BALF prima e durante i cambiamenti ambientali ha mostrato differenze caratteristiche tra cavalli affetti da RAO e controlli (Derksen et al., 1985; Fairbairn et al., 1993; McGorum et al., 1993). Tuttavia non c'è correlazione tra la citologia del BALF e dell'aspirato tracheale (Derksen et al., 1989; Franchini, comunicazione personale, 2000). Questa mancanza e il rigore dei testi statistici effettuati nel presente studio, può spiegare il perché non si osserva correlazione significativa tra i parametri della citologia del BALF e la reologia del muco tracheale. Pertanto, i risultati di questo studio non sostengono alcun valore predittivo diagnostico della citologia BALF riguardo alle modifiche reologiche indotte dall'ambiente; ma nemmeno escludono che le cellule infiammatorie e, in particolare, i loro prodotti di degradazione, possano avere un effetto sulla reologia del muco.

È interessante notare, che informazioni preliminari riguardo l'uso di mucolitici su un numero limitato di campioni di questo studio, hanno suggerito che il filamento

extracellulare di actina presente nel muco di animali affetti da RAO, in combinazione con fibre di DNA, aumenta la sua viscoelasticità (Gerber, dati non pubblicati).

Il risultato centrale di questo studio è stato la rilevazione che i cambiamenti ambientali dalla stabulazione alla dieta con fieno alterano negativamente la reologia del muco in cavalli affetti da RAO, ma no nei controlli. Gli autori concludono che le proprietà viscoelastiche dei campioni di muco tracheale provenienti da cavalli affetti da RAO in fase di remissione non differiscono da quelli dei cavalli normali. Durante l'esordio dei segni clinici di ostruzione delle vie aeree, tuttavia, la viscoelasticità del muco nei cavalli con RAO aumenta a valori osservati in gravi malattie ostruttive polmonari in ambito umano, riducendo sia la clearance muco ciliare che tosse. Tuttavia cambiamenti negativi della reologia del muco potrebbero contribuire alla stasi e all'accumulo di muco nelle vie aeree dei cavalli affetti da RAO in fase di esacerbazione, ma non in remissione.

Gerber e collaboratori (2004) hanno approntato un punteggio utile per oggettivare la quantità di muco presente nell'albero bronchiale. Il punteggio vede (fig. 2):

- punteggio uguale a 0 se non è presente muco;
- 1 se è presente sotto forma di singole gocce;
- 2 se sono presenti molte bolle anche confluenti;
- 3 se il muco è confluyente ventralmente;
- 4 se è presente una notevole quantità di muco nella porzione ventrale della trachea;
- 5 se il muco occupa almeno il 25% della trachea.

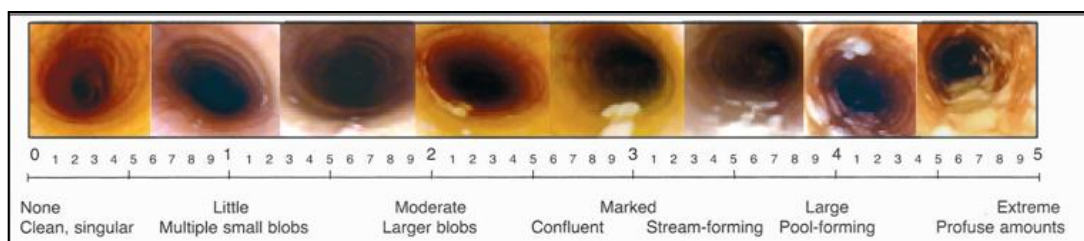


Figura 2 - Visualizzazione endoscopica del muco e formulazione di un punteggio per la sua valutazione (Gerber et al., 2004).

Ramzan e collaboratori (2008), al fine di valutare il grado di accumulo di muco nelle basse vie aeree, hanno elaborato un sistema di punteggio diviso in 2 parti:

- 1) punteggio assegnato alla quantità di muco tracheale visibile;
- 2) punteggio assegnato alla torbidità del fluido aspirato (Tabella 3).

A	Punteggio muco in trachea
0	No muco visibile. Mucosa tracheale pallida, anelli tracheali chiaramente definiti
1	Non più di un paio di piccolissimi puntini di muco; o un sottile strato non visibile finché instillata la soluzione di lavaggio
2	Lieve quantità di muco sia con diversi puntini lungo la trachea o come singolo grande accumulo ovunque in trachea
3	Moderata quantità di muco (+ decolorazione) con una stria continua o alcuni grandi accumuli di muco
4	Quantità marcata di muco, (+ decolorazione) con ampia stria continua in tutta la trachea + componenti di muco sulla parete dorsale
B	Punteggio torbidità fluido tracheale aspirato
0	“acqua di rubinetto” con al più pochi puntini di materiale flocculante.
1	Trasparente con soltanto scarsi livelli di materiale flocculante.
2	Trasparente o poco torbido / opaco (bianco) con moderato materiale flocculante.
3	Da moderato a marcato materiale flocculante; aspetto torbido .
4	Marcato, denso materiale mucoso + decolorazione, spesso difficile da aspirare.

Tabella 3 - Punteggi del muco in trachea e torbidità aspirato tracheale (Ramzan et al., 2008).

In alcuni studi, il punteggio del muco è stato incluso all'interno di un punteggio generale di infiammazione delle vie aeree insieme ai parametri cellulari (Chapman et al., 2000). In Tabella 4 sono riportati tutti i metodi utilizzati per la valutazione del muco nelle vie respiratorie del cavallo.

Dai molti studi eseguiti negli ultimi trenta anni, sembra emergere che il punteggio endoscopico dell'accumulo di muco sia l'unico metodo di facile esecuzione anche in campo, affidabile e in grado di fornire informazioni sulle patologie ad esso associate. Numerosi Autori hanno infatti evidenziato che l'aumento della produzione di muco è secondario allo stato infiammatorio dell'albero respiratorio (Robinson, 2003; Gerbere et al., 2004) dimostrando, così, una correlazione significativa tra l'aumento della popolazione neutrofila riscontrabile nel BALF e la presenza di muco in trachea (Dixon et al., 1995; Robinson et al., 2006; Holcombe 2006; Laus et al., 2009). Nello studio di Holcombe e collaboratori (2006) la valutazione macroscopica del muco tracheale, eseguita utilizzando la scala di punteggio suggerita da Gerber e collaboratori (2004), è stata messa in correlazione con l'età. Gli Autori hanno dimostrato che all'aumentare dell'età diminuiva il punteggio assegnato al muco tracheale. , poiché avevano trovato una correlazione significativa tra l'iperplasia faringea linfonodale (PLH), patologia che interessa maggiormente i cavalli giovani rispetto agli adulti, e l'incremento del punteggio del muco tracheale.

Tecniche e metodiche	Vantaggi e limiti
Punteggio endoscopico dell'accumulo di muco (Gerber et al., 2004)	Tecnica affidabile, clinicamente applicabile quando si utilizza una scala di classificazione standardizzata e osservazioni ripetute. Non utilizzare i punteggi composti che includono criteri citologici.
Punteggio della viscosità, colore e posizione del muco (Dieckmann 1987; Gerber et al., 2004)	Gli estremi della localizzazione (dorsale rispetto a ventrale forniscono indicazioni della viscoelasticità e la viscosità apparente è associata con la gravità della malattia, ma la ripetibilità sia inter- che intra-osservatore non è realizzabile.
Reologia; microreometria, viscosimetria di volume e altre tecniche specialistiche (Gerber et al., 2000)	Metodo di ricerca; tecnicamente impegnativo, attuabile soltanto in laboratori specializzati.
RT-PCR; ELISA/ELLA per la misurazione della produzione di mucina (Jefcoat et al. 2001; Gerber et al., 2003a)	Metodo di ricerca; può essere effettuata mediante impegno moderato. Problemi con la specificità di ELISA e ELLA, soprattutto quando vengono caratterizzati i carboidrati.
Istologia cellulare e morfometria del muco (Viel, 1980)	Tecniche laboriose, risultati affidabili. Invasiva; per la toracoscopia è necessario un grande campione di biopsia.
Misurazione della velocità di clearance mediante endoscopia (Sweeney 1989; Turgut e Sasse 1989; Im Hof et al., 1994) o marcatori radioattivi (Willoughby et al., 1991)	Principalmente per ricerca, ma tecniche praticamente applicabili clinicamente; standardizzazione non semplice, necessarie misurazioni ripetute.
Cellule ciliate: frequenza del battito ciliare <i>ex vivo</i> (Gerber et al., 1997a)	Metodo di ricerca; tecnicamente impegnativo.

Tabella 4 - Metodi di valutazione del muco presente nell'albero bronchiale: vantaggi e limiti di ognuno (Gerber e Robinson, 2007). Legenda: RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELLA, enzyme-linked lectin assay.

8.3 Cellule epiteliali

(Bain, 1997; Zinkl, 2002)

Le cellule epiteliali osservabili sono: cellule dell'epitelio ciliato colonnare, cellule non ciliate di vario tipo e cellule globose. Le cellule dell'epitelio ciliato colonnare sono allungate con *cilia* fini all'estremità opposta del nucleo.

Le cellule globose sono di aspetto simile alle precedenti, ma non presentano *cilia* e possono contenere granuli mucosi al loro interno. Frequentemente possono essere osservati gruppi di cellule epiteliali basofile che vengono asportate durante processi infiammatori multifocali nel contesto di flogosi generalizzate.

Nel caso del TW sono normalmente presenti un certo numero di cellule squamose provenienti dall'orofaringe che appaiono moderatamente basofile, di aspetto largo, appiattito o ripiegato e molte di queste hanno batteri adesi alla loro superficie. La loro presenza indica il naturale allontanamento dei batteri commensali o più di rado la contaminazione attraverso il fisiologico rinnovo della mucosa respiratoria, pertanto il risultato dell'esame batteriologico dovrebbe essere interpretato alla luce del genere di batterio isolato e del processo infiammatorio rilevato (Viel et al., 1999).

Le cellule epiteliali ciliate possono essere presenti, anche se in basso numero, nei campioni di TW, ma sono assenti nel BALF. L'aumento del numero di cellule ciliate nel preparato citologico, isolate o in cluster, è definito ciliocitoforia. Tale fenomeno si presenta in corso di processo flogistico in atto a livello di albero bronchiale. Le possibili cause possono essere infezioni virali anche in forma sub-acuta.

La presenza di eritrociti può essere causata da microtraumi durante l'esecuzione del BAL, da processi infiammatori o da emorragia polmonare indotta dallo sforzo (EIPH).

8.4 Materiale estraneo all'apparato respiratorio

(Zinkl, 2002)

Il rilievo di materiale estraneo all'apparato respiratorio è secondario all'inalazione di sostanze che non sono state successivamente espettorate tramite l'attività mucociliare dell'epitelio respiratorio o alla contaminazione del BAL durante l'esecuzione dell'endoscopia.

I batteri possono essere sia commensali che di contaminazione provenienti dalle alte vie aeree, dal cavo orale o ambientali. In questo caso il significato della presenza di batteri può essere interpretato correttamente sulla base dell'esame citologico e della sintomatologia. Ad esempio la presenza di *Simonsiella* spp. conferma la contaminazione del campione con materiale proveniente dall'oro-faringe dove questo tipo di batterio è presente.

Infine altri materiali contaminanti di frequente osservazione sono pollini, ife o spore, frammenti vegetali, strutture cristalline libere o contenute all'interno dei macrofagi.

Spirali di Curschmann costituiscono una matrice di muco che rappresenta l'impronta di un bronchiolo. La formazione di dette spirali è legata alle modificazioni reologiche del muco in corso di RAO (Recurrent Airway Obstruction) secondarie al processo infiammatorio cronico (Deconto, 1985; Zinkl, 2002; Viel e Hewson, 2003).

9 FATTORI CHE INFLUENZANO LA CONTA CELLULARE TOTALE E LA CONTA CELLULARE DIFFERENZIALE

L'utilizzo di piccole quantità di soluzione fisiologica (50 ml) è stata associata alla conta di percentuali elevate di neutrofili e ridotte percentuali di mastociti, rispetto all'uso di quantità maggiori (300 ml) (Sweeney et al., 1994).

Questo risultato suggerisce che scarsi volumi di BALF sono rappresentativi di un lavaggio bronchiale più che broncoalveolare. E' necessario quindi ricorrere all'inoculazione di volumi elevati per ottenere un lavaggio delle vie aeree più profonde e quindi anche alveolare (Sweeney e Beech, 1991).

Alcuni Autori hanno messo a confronto i risultati della citologia di campioni di BALF ottenuti mediante 3 lavaggi consecutivi con un volume di 100 ml di soluzione fisiologica, rispetto ai risultati ottenuti da un unico lavaggio con 300 ml. Se inizialmente non sono emerse differenze tra le tre aliquote (Mair et al., 1987), successivamente è stato osservato che un lavaggio sequenziale delle basse vie aeree favorisce un aumento del volume di BALF recuperato e anche un aumento della componente dei macrofagi (Sweeney et al., 1992).

La quantità di soluzione fisiologica iniettata e il volume di BALF recuperato sono quindi due punti critici nell'esecuzione del BAL, che possono influenzare i risultati dell'esame citologico. Pickles et collaboratori (2002c) hanno affrontato questo punto mettendo a confronto la citologia ottenuta da aliquote sequenziali (100 ml ciascuna) tra loro e con un loro pool. L'ipotesi dell'autore è che ciascun lavaggio rimuove le cellule dal tratto bronchiale e le spinge più in profondità verso lo spazio bronco-alveolare. All'esame citologico sono stati presi in considerazione la Conta Cellulare Totale e la Conta Cellulare Differenziale delle popolazioni dei neutrofili, macrofagi, linfociti ed eosinofili. Dallo studio emerge che non ci sono differenze significative tra le aliquote per quanto riguarda la Conta Cellulare Totale ed essa è risultata in media superiore a 300 cell/ul. Questo dato confermerebbe l'ipotesi che lavaggi sequenziali determinano uno scivolamento delle cellule verso zone più profonde dell'albero respiratorio e quindi una maggiore cellularità del campione di BALF. Il risultato di Pickles e collaboratori (2002c) è confermato anche da un lavoro precedente in cui è stato dimostrato che l'utilizzo di 300 ml in unica infusione fa

ottenere un numero inferiore di cellule alla conta cellulare totale (<300 cell/ul) (Sweeney e Beech, 1991).

Anche la percentuale di neutrofili non varia tra le 3 aliquote e il loro pool, quindi ciascuna aliquota è da considerarsi rappresentativa della reale percentuale dei neutrofili del campione raccolto. Questo dato è importante poiché in soggetti affetti da RAO, a causa del broncospasmo, si ottengono generalmente scarsi volumi di BALF, quindi anche piccole quantità di BALF (20 ml) possono avere un valore diagnostico per una flogosi neutrofilica, tipica della RAO.

La conta differenziale ottenuta per i macrofagi e i linfociti risulta, invece, diversa tra le tre aliquote e il pool. I macrofagi aumentano nelle ultime aliquote, mentre i linfociti hanno un andamento inverso. Questo risultato confermerebbe che si può ottenere un BALF effettivamente rappresentativo di un lavaggio dello spazio bronco-alveolare ricorrendo a volumi cospicui non inferiori a 300 ml.

Sad e collaboratori (2013) affermano che l'età non influenza significativamente la conta differenziale di cellule nucleate, invece nello studio di Gerber e collaboratori (2003b) si evidenzia che nei soggetti giovani (<8 anni di età) si osserva un aumento della conta cellulare totale e dei neutrofili rispetto a cavalli adulti (>12 anni di età).

Il numero totale di cellule nucleate (TCNN) del BAL non cambia dopo un intenso esercizio fisico, anche se è aumentato, dopo un periodo di allenamento nei cavalli da corsa (McKane et al., 1993; Raidal et al., 2000). Questi autori hanno suggerito che un tale aumento, insieme a un aumento riportato nella proporzione di neutrofili in campioni di BAL, può rappresentare una risposta infiammatoria di basso grado in reazione all'allenamento. Altri autori hanno riferito che i cavalli in allenamento avevano una conta cellulare media inferiore per un periodo di 10 settimane rispetto ad un gruppo di cavalli a riposo (Clark et al., 1995) .

I soggetti di sesso femminile hanno più cellule totali/ml e neutrofili rispetto ai maschi (Robinson et al., 2006).

Inoltre in uno studio recente (Depecker et al., 2014) si è evidenziato che la parte di polmone campionato può influenzare in modo significativo i profili citologici del BAL. I dati citologici provenienti dal campionamento dei polmoni di destra e di sinistra sono stati confrontati e specificamente utilizzati per classificare cavalli affetti da EIPH e da IAD. Le conte cellulari totali non mostrano significative differenze tra i due polmoni. Le conte cellulari differenziali riguardo alle percentuali di neutrofili e di emosiderofagi, in particolare il rapporto emosiderofagi/macrofagi, sono

significativamente più alti nel polmone destro rispetto al sinistro. Le conte cellulari differenziali per gli altri tipi di cellule non mostrano significative differenze in entrambi i polmoni. Questa differenza in particolare riguardo la maggiore percentuale dei neutrofili nel polmone destro rispetto al sinistro può essere dovuta alla sua caratteristica anatomica (disposizione dritta del bronco principale destro) che porterebbe quindi il polmone destro ad una maggiore esposizione ad allergeni e microrganismi.

10 PARTE SPERIMENTALE

Il presente studio è stato condotto nel biennio 2010-2013 presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa a San Piero a Grado (PI).

La sperimentazione è volta allo studio di variabili in grado di influenzare la valutazione del BALF e, in particolare, la valutazione della ripetibilità nella lettura dei WBC e della quantità di muco nel BALF.

Il protocollo della sperimentazione è stato approvato dal C.E.A.S.A., Università di Pisa e finanziata con fondi Miur ex 60%.

10.1 Introduzione

La conta cellulare totale (numero di cellule/ μ l) e le percentuali delle popolazioni cellulari presenti nel liquido refluo del lavaggio bronco-alveolare (BALF) sono valutazioni importanti nella diagnosi e terapia delle patologie delle basse vie respiratorie del cavallo. E' noto che il numero totale di cellule/ μ l è influenzato dalla tecnica adottata per la raccolta del BAL, come ad esempio la quantità di soluzione salina iniettata o la quantità di fluido refluo raccolto, dal contacellule usato per la lettura o dalla quantità di muco e/o materiale organico (Hewson e Viel, 2002; Hodgson e Hodgson, 2007).

Lo scopo del presente studio sperimentale è stato quello di verificare l'affidabilità degli strumenti di laboratorio nel produrre valori ripetibili e quindi attendibili della conta cellulare totale con contacellule automatico e della torbidità del BALF, quale espressione della presenza di muco attraverso l'analisi allo spettrofotometro. Pertanto sono state eseguite la:

- 1) Valutazione della ripetibilità della lettura mediante un contaglobuli per la quantificazione delle cellule totali nel BALF;
- 2) Quantificazione del muco del BALF mediante lettura allo spettrofotometro correlandolo al "*mucus score*" tracheale (Gerber et al., 2004).

10.2 Materiali e metodi

La popolazione campione su cui è stata condotta la sperimentazione era composta da:

- 41 cavalli: femmine fattrici di razza trotter;
- età compresa tra 3-10 anni;
- peso 435-563 kg (BCS medio 4);
- tutte sottoposte allo stesso tipo di gestione.

10.2.1 Gestione delle cavalle

Le fattrici erano poste in stabulazione libera all'interno di paddock 30 x 40 m, e per ogni paddock era previsto un numero massimo di 10 soggetti. L'alimentazione era a base di fieno polifita somministrato *ad libitum* e di concentrati solo al pasto serale. Tutti i soggetti erano sottoposti a profilassi vaccinale per influenza, tetano e herpesvirus e trattati per parassitosi gastro-intestinali (ivermectina, 0,2 mg/kg PO) secondo le linee guida dell'American Association of Equine Practitioners Infectious Disease Committee (Available at: http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed April 10, 2010).

La sera prima dell'esecuzione del BAL, le cavalle venivano spostate in box, 4 x 4 m, su lettiera in paglia e veniva somministrato un pasto leggero a base di fieno bagnato (4 kg di fieno pesato a secco). La mattina seguente la cavalle venivano lasciate a digiuno al fine di minimizzare i rischi legati all'effetto dei sedativi sulla motilità intestinale. Dopo l'esecuzione del BAL, le cavalle facevano ritorno ai box dove erano tenute sotto osservazione e a digiuno fino alla sera, e quindi re-imbrancate nei rispettivi paddocks.

10.2.2 Criteri di inclusione

- 1) I soggetti erano a riposo dall'attività agonistica non per cause legate a patologie dell'apparato respiratorio;
- 2) Vivevano in condizione di stabulazione libera (paddock) da un periodo superiore a 5 mesi;
- 3) Non presentavano patologie delle vie aeree profonde, valutata sulla base di:
 - Esame Obiettivo Generale e Particolare dell'apparato respiratorio;
 - Esame ecografico delle pleure (sonda convex, 5 MHz, Falco, Esaote, FI);
 - Conta cellulare totale e differenziale nella norma (Hewson e Viel, 2002; Hodgson e Hodgson, 2007).

Sono stati eseguiti 41 BAL con tecnica endoscopica e recuperati 41 campioni di BALF. Il BAL è stato eseguito con un colonscopio di 180 cm di lunghezza con

diametro terminale di 13 mm (Olympus CF Type EL, Giappone) secondo la tecnica standardizzata (Hodgson e Hodgson, 2007). I soggetti sono stati posti in un travaglio, sedati con xilazina (0,4 mg/kg EV) e immobilizzati con torcinaso. Durante la discesa lungo la trachea e prima dell'esecuzione del BAL, la quantità di muco tracheale è stata quantificata con un punteggio da 0 a 5, secondo quanto riportato in letteratura (Gerber et al., 2004) (figg. 3 e 4).

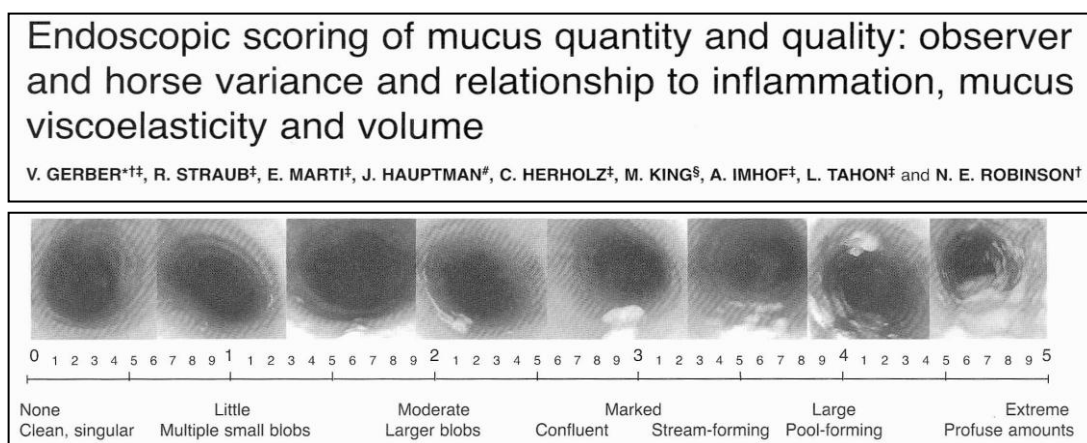


Figura 3 - Score endoscopico per la valutazione quantitativa del muco tracheale (Gerber et al., 2004).

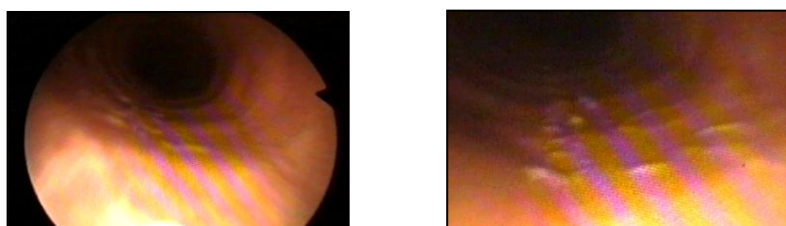


Figura 4 - Visualizzazione endoscopica di muco in trachea. SCORE 3.

Al fine di ridurre il riflesso tussigeno è stato iniettato un anestetico locale (lidocaina 1%). Giunti a livello del sito di campionamento, sono stati quindi inoculati 300 ml di soluzione fisiologica sterile a 37°C con un catetere sterile introdotto nel canale di servizio dell'endoscopio. Il BALF è stato aspirato mediante suzione con siringhe da 60 ml in 3 aliquote da 40 ml ciascuna raggiungendo così un volume totale di almeno 120 ml, pari a circa il 40% della soluzione fisiologica iniettata. E' stato possibile recuperare 120 ml in tutti i lavaggi eseguiti e questo è stato un parametro di inclusione importante dell'indagine per ottenere una adeguata cellularità e eseguire la conta cellulare differenziale in condizioni ottimali (Hodgson e Hodgson, 2007; Sgorbini et al., 2010).

Dopo omogeneizzazione delle tre aliquote sono stati prelevati 3 ml da ciascuna e raccolti in una provetta in EDTA per un totale di 9 ml, denominato campione finale. I campioni finali sono stati utilizzati per la misurazione della conta cellulare totale dei WBC ed infine da essi sono stati allestiti dei preparati citologici mediante citocentrifugazione (400 μ l centrifugati a 350 rpm per 5 minuti) (Cytofuge 2, StatSpin, USA) per eseguire la conta cellulare differenziale. I preparati citologici sono stati asciugati all'aria e colorati con metodo Diff-Quick (Dade spa, MI). La conta differenziale è stata determinata su almeno 400 cellule per preparato mediante lettura al microscopio 100X.

Al fine di verificare il primo scopo del lavoro, sui 41 campioni finali è stata eseguita la conta cellulare totale (WBC totali) per 10 volte consecutivamente mediante lettura al contaglobuli (HecoVet, Seac, Firenze).

Per verificare il secondo scopo del lavoro, i 41 campioni finali sono stati sottoposti per 10 volte consecutive a lettura mediante spettrofotometro (Slim, SEAC, FI) a lunghezza d'onda di 640 nm ed i risultati sono stati espressi in densità ottica (DO).

10.3 Analisi statistica

1. Ripetibilità lettura WBC al contaglobuli

Sui dati ottenuti dalla lettura mediante contaglobuli della conta cellulare totale (WBC) è stata verificata la distribuzione dei dati mediante il Shapiro-Wilk normality test. Poichè la distribuzione dei dati è risultata normale, è stata effettuata l'analisi della varianza a una via (ANOVA) per misure ripetute e il Tukey's Multiple Comparison test come *post hoc* sulle 10 valutazioni dei WBC totali, al fine di evidenziare differenze tra le letture. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$.

2. Quantificazione muco mediante spettrofotometro

Anche per i risultati ottenuti mediante lettura allo spettrofotometro è stata verificata la distribuzione dei dati delle DO mediante il Shapiro-Wilk normality test. Poichè la distribuzione è risultata normale, è stata effettuata

l'analisi della varianza a una via (ANOVA) per misure ripetute e il Tukey's Multiple Comparison test come *post hoc* sulle 10 letture delle DO al fine di verificare eventuali differenze nelle letture allo spettrofotometro. I risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$.

3. Correlazione mucus score tracheale e muco BALF

E' stata calcolata la media delle 10 letture delle DO (X-DO) per ogni campione ed è stata valutata la distribuzione dei dati mediante Shapiro-Wilk normality test. Poiché la distribuzione è risultata gaussiana, è stato applicato il test di Pearson per valutare la correlazione tra X-DO e il *mucus score*. Anche in questo caso i risultati sono stati considerati significativi per $p < 0,05$.

10.4 Risultati

L'analisi della varianza non ha messo in luce differenze statisticamente significative tra le 10 letture eseguite, sia per i WBC che per le DO ($p < 0,05$).

E' stata evidenziata una correlazione positiva e statisticamente significativa tra le medie delle DO e il *mucus score* ($p < 0,05$; $r: 0,4$) (fig. 5).

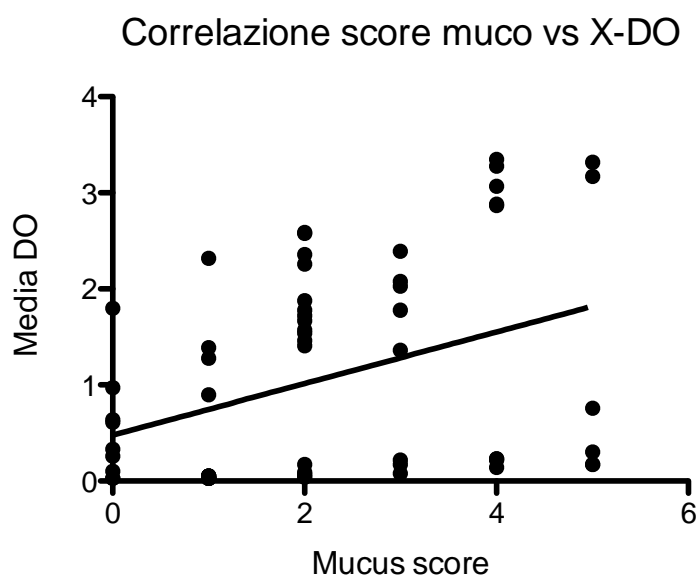


Figura 5 – Grafico correlazione tra la media delle DO e mucus score ($r: 0,4$; $p < 0,05$).

10.5 Discussione e conclusioni

La quantificazione del numero totale di cellule/ μ l, ed in particolare la conta totale dei WBC nel BALF, è di aiuto sia nella valutazione complessiva del preparato citologico, che nell'interpretazione della conta differenziale delle diverse popolazioni della linea bianca raccolte dalle vie respiratorie profonde. E' noto però che il numero totale di cellule/ μ l nel campione è soggetto a variabilità legata a diversi fattori, quali il volume di soluzione fisiologica iniettata, il volume di liquido refluo raccolto, la tecnica di campionamento e l'errore legato allo strumento di lettura (Mair et al., 1987; Pickles et al., 2002b,c).

Di conseguenza anche i valori di riferimento riportati in bibliografia sono variabili (Hodgson e Hodgson, 2007). Per questo motivo la conta cellulare totale del BALF è ancora ritenuta da alcuni autori di scarsa utilità (Sweeney e Beech, 1991; Pickles et al., 2002c; Hodgson e Hodgson, 2007), mentre da altri è considerata necessaria quale *screening* per differenziare cavalli sani da quelli affetti da IAD o RAO (Rush e Mair, 2004; Sgorbini et al., 2010).

Nel presente studio abbiamo voluto valutare la ripetibilità della misurazione della conta cellulare totale del campione di BALF ottenuto con metodica standardizzata (Hodgson e Hodgson, 2007), al fine di evidenziare eventuali variazioni legate allo strumento di lettura. In particolare la variabilità dei WBC è stata valutata *intra-assay* e *intra-day*. La scelta dell'*inter-assay* è stata basata sul fatto di valutare la stabilità nella lettura di un campione al fine di chiarire se la valutazione della conta cellulare totale dei BALF fosse eccessivamente influenzata dalla lettura con il contaglobuli. La scelta della valutazione *intra-day* è dovuta al fatto che le cellule vanno rapidamente incontro a degenerazione e quindi la lettura a 24 ore di distanza sarebbe comunque non rappresentativa della popolazione infiammatoria cellulare presente in un BALF. La valutazione *intra-day* della DO per la valutazione quantitativa del muco è stata preferita alle altre valutazioni per il fatto che il muco con il tempo si deposita sul fondo della provetta formando aggregati che rendono difficile la loro successiva messa in sospensione e quindi non oggettiva la valutazione *inter-day*.

I risultati da noi ottenuti confermano un'ottima ripetibilità di tale misurazione per mezzo del contacellule. Questo risultato è di grande utilità clinica poiché mostra che la conta cellulare totale è un valore costante e utilizzabile come parametro di laboratorio. Inoltre in base ai risultati del nostro studio sembra più realistico

individuare un *cut off* tra soggetti sani e patologici più alto rispetto a quello indicato nella letteratura tradizionale, e quindi superiore a 300 cell/ μ l come indicato anche dalla letteratura più recente (Pickles et al., 2002c). In base alla nostra esperienza è tuttavia consigliabile eseguire almeno 2 o 3 letture di verifica sul singolo campione soprattutto in presenza di una quantità cospicua di muco.

I risultati della misurazione mediante spettrofotometro della torbidità del campione di BALF confermano che lo strumento offre un'ottima ripetibilità della stima della presenza di muco nel campione. I nostri risultati supportano l'utilità della misurazione della torbidità del BALF allo spettrofotometro per la quantificazione del muco a livello delle basse vie aeree, perché correla con il *mucus score* tracheale. In questo modo è possibile ottenere un valore di laboratorio e quindi oggettivo della quantità di muco presente. Nella nostra indagine all'aumentare del muco tracheale incrementava la DO del BAL. I nostri risultati concordano con le osservazioni di AA (Koblinger et al., 2011) che hanno evidenziato una correlazione positiva tra la quantità di muco tracheale e bronchiale. Infine la valutazione della torbidità del liquido refluo potrebbe essere un valido aiuto nella valutazione quali-quantitativa del BALF anche in relazione al fatto che è di rapida esecuzione, di bassissimo costo e consente di limitare gli errori di interpretazione della presenza di muco in trachea o nei bronchi causati da inesperienza dell'operatore o difficoltà contingenti quali per esempio l'esecuzione "in campo", indole del soggetto, etc..

11 CONCLUSIONI GENERALI

L'esame endoscopico del tratto respiratorio offre indubbi vantaggi per l'ispezione delle vie aeree sino a che la lunghezza e calibro dell'endoscopio lo permettono, la quantificazione del muco e il prelievo del BALF (Beech, 1991; McGorum et al., 1993a; Hewson e Viel, 2002). La nostra indagine conferma quanto importante sia standardizzare la metodica di prelievo del BALF utilizzando un endoscopio di 180 cm di 13 mm di diametro e la quantità di 300 ml di soluzione salina in cavalli di 400-500 kg. I campioni di BALF prelevati nella quantità di 120 ml presentavano una cellularità adeguata per permettere agevolmente la lettura con contaglobuli automatico e per allestire preparati citologici di buona qualità. La citocentrifugazione ha consentito di standardizzare ulteriormente la valutazione del preparato citologico perché sono stati usati sempre gli stessi volumi di BALF e concentrati in una porzione circolare di 6 mm di diametro del vetrino portaoggetto.

I risultati a riguardo della conta cellulare totale permettono allo studio di suggerire che, sebbene non sia ancora chiara l'importanza di questo parametro ai fini della valutazione del quadro flogistico delle basse vie aeree, il *cut off* debba non essere inferiore a 300 cell/ μ l perché anche il reclutamento di cellule infiammatorie secondario alla sola stimolazione ambientale è sufficiente a superare in molti casi questo limite. Per questo motivo riteniamo che l'anamnesi ambientale debba tenere in giusto conto questo fattore per valutare criticamente i risultati dell'esame del BALF perché questa indagine dimostra che dopo esposizione ad allergeni/antigeni ambientali la conta cellulare totale, i neutrofili, gli eosinofili e la produzione di muco sono aumentati. La ripetibilità della lettura al contaglobuli conforta sui risultati forniti dallo strumento rendendo più attendibile il dato. In base alla nostra esperienza è tuttavia consigliabile eseguire almeno 2 o 3 letture di verifica sul singolo campione in particolare in presenza di una quantità cospicua di muco.

I risultati dell'esame citologico delle tre frazioni sequenziali confermano in gran parte quanto osservato da AA (Mair et al., 1987; Pickles et al., 2002c) e sottolineano l'importanza di collezionare quantità di circa 120 ml di BALF in modo da ottenere un campione che verosimilmente ha raggiunto anche le vie aeree alveolari e raccolto cellule infiammatorie rappresentative in quantità e giuste percentuali dello stato flogistico delle basse vie aeree. I risultati della misurazione mediante

spettrofotometro della torbidità del campione di BALF per la stima della presenza di muco correlano con il *mucus score* tracheale. Questo permette di rendere oggettivo un importante parametro clinico con rapidità e limitato impegno economico.

I batteri isolati sia prima che dopo la stimolazione appartengono alla micro-flora commensale bronchiale e lo *S. zooepidemicus*, che è il batterio più frequentemente isolato nelle infezioni delle vie respiratorie (Slater, 2004), è stato isolato solo con PCR e non con l'esame batteriologico, in appena tre casi nel prelievo dopo stimolazione ambientale. Sulla base di questi risultati sembra che in cavalli sani il reclutamento di cellule infiammatorie, la produzione di muco e verosimilmente la competente barriera mucosa siano sufficienti a non permettere la colonizzazione batterica delle basse vie aeree anche quando il confinamento in ambienti chiusi espone l'apparato respiratorio a un carico ambientale maggiore di allergeni e antigeni. In conclusione, il numero limitato di indagini per la valutazione dei problemi delle basse vie aeree del cavallo, impone ai clinici l'utilizzo di metodiche come quelle indagate nella presente tesi. Per questo motivo corre l'obbligo di seguire in maniera scrupolosa le indicazioni della letteratura scientifica specialistica per il campionamento del BALF in modo da valutare correttamente i dati di laboratorio.

A nostro avviso sarebbe importante che altre indagini studiassero quanto la presenza di muco alteri la conta cellulare totale e la valutazione percentuale delle cellule infiammatorie che inevitabilmente imprigiona.

12 BIBLIOGRAFIA

Ainsworth DM, Weldon AD, Beck KA, Rowland PH (1993). Recognition of *Pneumocystis carinii* in foals with respiratory distress. *Equine Vet J*, 25(2): 103-8.

Ainsworth DM, Hackett RP (2004). Fungal Pneumonia. In Rush B, Mair T (eds): *Equine respiratory diseases*. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing Co, Oxford, UK, pp. 285-7.

Allen KJ, Tremaine WH, Franklin SH (2006). Prevalence of inflammatory airway disease in national hunt horses referred for investigation of poor athletic performance. *Equine Vet J Suppl*, 36: 529-34.

Armstrong J, White J, (1950). Liquefaction of viscous purulent exudates by deoxyribonuclease. *Lancet*, 2: 739-42.

Anderson S, Shires VL, Wilson RA, Mountford AP (1999). Formation of multinucleated giant cells in the mouse lung is promoted in the absence of interleukin-12. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20(3): 371-8.

App EM, Zayas JG, King M (1993). Rheology of mucus and transepithelial potential difference: small airways versus trachea. *Eur Respir J*, 6: 67-75.

Bain FT (1997). Cytology of the respiratory tract. *Vet Clin North Am Eq Pract*, 13(3): 477-86.

Beech J (1975). Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. *Vet Pathol*, 12(3): 157- 64.

Beech J (1991). Chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 7(1): 79-91.

Brazil TJ, McGorum BC (2001). Molecules and mediators of inflammation in equine heaves: mechanisms and marker of disease. *Equine Vet J*, 33(2): 113-5.

Bursh GE, Jensen B (1987). The use of cytology in the diagnosis of equine respiratory infections. *Equine Pract*, 9(2): 7-10.

Cardwell JM, Christley RM, Gerber V, Malikides N, Wood LJLN, Newton JR, Hodgson JL (2011). What's in a name? Inflammatory airway disease. *Equine Vet J*, 43(6): 756-8.

Clark CK, Lester GD, Vetro T, Rice B (1995). Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. *Aust Vet J*, 72(7): 249-52.

Coombs SL, Webbon PM (1987). Observations on tracheal mucociliary clearance in horses. *Tierarztl Prax Suppl*, 2: 5-9.

Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JL, Lavoie JP (2007). Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med* 21(2): 356–61.

Crystal RG, Reynolds HY, Kalica AR (1986). Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. *Chest*, 90(1): 122-31.

Depecker M, Richard EA, Pitel PH, Fortier G, Leleu C, Courouc -Malblanc A (2014). Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: Influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *Vet J*, 199(1): 150-6.

Derksen FJ, Scott JS, Miller DC, Slocombe RF, Robinson NE (1985) Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am Rev Respir Dis*, 132: 1066-70.

Derksen FJ, Robinson NE, Scott JS, Stick JA. (1988). Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). J Vet Res, 49(6): 933-8.

Derksen FJ, Brown CM, Sonea I, Darien BJ, Robinson NE (1989). Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar cytology in 50 horses with chronic lung disease. Equine Vet J, 21: 23-26.

Dieckmann MP (1987). Zur Wirksamkeit von Ambroxolhydrochlorid (Mukovent) bei lungenkranken Pferden klinische, funktionelle und zytologische Untersuchungen. Inaugural Dissertation (Dr. med. vet.), Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.

Di Fabio V, Ferrucci F, Zucca E, Croci C (2003). Emorragia polmonare da sforzo (EIPH): diagnosi e valutazione citologica degli emosiderociti nel lavaggio broncoalveolare (BAL) in 77 cavalli trottatori. LVI Congresso nazionale SISVet, Ischia (NA), pp. 259-60.

Dixon PM, Railton DI, McGorum BC (1995). Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. Equine Vet J, 27(6): 428-35.

Dixon PM (1997). Ancillary diagnostic techniques for the investigation of equine pulmonary disease. Equine Vet Educ, 9(2): 72-80.

Edwing PJ, Cowell RL, Tyler RD, MacAllister CG, Meinkoth JH (1994). *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals. J Am Vet Med Assoc, 204(6): 929-33.

Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM (1993). Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. Clin Expt Allergy, 23: 821-28.

Fleury-Feith J, Escudier E, Pocholle MJ, Carre C, Bernaudin JF (1987). The effects of cytocentrifugation on differential cell counts in samples obtained by bronchoalveolar lavage. Acta Cytol, 31(5): 606-10.

Freeman KP, Roszel JF, McClure JM, Mannsman R, Patton PE, Naile S (1993). A review of cytological specimens from horses with and without clinical signs of respiratory disease. *Equine Vet J*, 25(6): 523-6.

Fogarty U (1990). Evaluation of bronchoalveolar lavage technique. *Equine Vet J*, 22(3): 174-6.

Fogarty U, Buckley T (1991). Bronchoalveolar lavage finding in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J*, 23(6): 434-7.

Gerber V (1995). Untersuchungen über die mukoziliäre Clearance in der Luftröhre des Pferdes [Investigation of mucociliary clearance in equine trachea]. Dissertation, University of Berne, Switzerland.

Gerber V, Gehr P, Straub R, Frenz M, King M, Im Hof V (1997a). Mucus quality on horse tracheal epithelium: microscopic grading based on transparency. *Respir Physiol* 107(1): 67-74.

Gerber V, Gehr P, Straub R, King H, Im Hof V (1997b). Microscopic investigation of mucus qualities, mucus transport velocity and ciliary beat frequency on horse tracheal epithelium. *Respir Physiol*, 107: 67-74.

Gerber V, King M, Schneider DA, Robinson NE (2000). Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*, 32(5): 411-7.

Gerber V, Robinson NE, Venta RJ, Rawson J, Jefcoat AM, Hotchkiss JA (2003a). Mucin genes in horse airways: MUC5AC, but not MUC2, may play a role in recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*, 35(3): 252-7.

Gerber V, Robinson NE, Luethi S, Marti E, Wampfler B, Straub R (2003b). Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Vet J*, 35(5): 491-5.

Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, Imhof A., Tahon L, Robinson NE (2004). Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J*, 36(7): 576-82.

Gross DK, Hinchcliff KW, French PS, Goclan SA, Lahmers KK, Lauderdale M, Ellis JA, Haines DM, Slemons RD, Morley PS (1998). Effect of moderate exercise on the severity of clinical signs associated with influenza virus infection in horses. *Equine Vet J* 30(6): 489-97.

Hare JE, Viel L, O'Byrne PM, Conlon PD (1994). Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Ther*, 17(3): 237-44.

Hare JE, Viel L (1998). Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J Vet Intern Med*, 12(3): 163-70.

Helming L, Gordon S (2007). The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology*, 212(9-10): 785-93.

Hewson J, Viel L (2002). Sampling microbiology and cytology of the respiratory tract. In: Lekeux P(Ed) . *Equine Respiratory Diseases*. IVIS, Ithaca, New York, USA.

Hodgson JL, Hodgson DR (2003). Tracheal Aspirates: indications, technique, and interpretation. In Robinson NE (Ed): *Current therapy in Equine medicine*. 5th ed. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 401-6.

Hodgson JL, Hodgson DR (2007). Collection and Analysis of Respiratory Tract Samples. In McGorum BC, Robinson NE, Schumacher J, Dixon PM (eds): *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Saunders Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania, USA, p. 134.

Hoffman AM, Viel L (1997). Techniques for sampling the respiratory tract of horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 13(3): 463-75.

Hoffman AM, Mazan MR, Ellenberg S. (1998). Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res*, 59(2): 176-81.

Hoffman AM (1999). Bronchoalveolar lavage technique and cytological diagnosis of small airway inflammatory disease. *Equine Vet. Educ*, 11(6): 330-36.

Hoffman AM, Mazan MR (2003). Airway obstruction and hyper-reactivity in horses with signs of inflammatory airway disease. In Hoffman AM, Robinson NE, Wade JF (eds): Workshop on "Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome". R&W Publications Ltd, Newmarket, UK, pp. 71-4.

Holcombe SJ, Jackson C, Gerber V, Jefcoat A, Berney, C Eberhardt S, Robinson NE (2001). Stabling in associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J*, 33(3): 244-9.

Im Hof V, Schuerch S, Straub R, Gehr P (1994). Videoendoscopic estimation of tracheal mucus velocity in non-anaesthetized horses. *Am J Respir Crit Care Med*, 149: 1023.

Available at: http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed April 10, 2010.

Jang SS, Biberstein EL, Hirsh DC (1987). *Actinobacillus suis*-like organisms in horses. *Am J Vet Res*, 48(7): 1036-8.

Jefcoat AM, Hotchkiss JA, Gerber V, Harkema JR, Basbaum CB, Robinson NE (2001). Persistent mucin glycoprotein alterations in equine recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281(3): L704-12.

King M (1979). Interrelation between mechanical properties of mucus and mucociliary transport: effect of pharmacologic interventions. *Biorheology*, 16: 57-68.

King M (1988). Magnetic microrheometer. In Braga PC, Allegra L (eds): *Methods in Bronchial Mucology*. Raven Press Ltd, New York. pp 73-83.

King M, Rubin BK (1994). Rheology of airway mucus: relationship with clearance function. In Takishima T, Shimura S (eds): *Airway secretion: Physiological Bases for the Control of Mucous Hypersecretion (Lung Biology in Health and Disease, Vol. 72)*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp 283-314.

Lam S, Le Riche JC, Kijek (1985). Effect of filtration and concentration on the composition of bronchoalveolar lavage fluid. *Chest*, 87(6): 740-2.

Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP (1994). Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet J*, 26(3): 227-9.

Larson VL, Busch RH (1985). Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopatologic findings. *Am J Vet Res*, 46(1): 144-6.

Laus F, Preziuso S, Spaterna A, Beribè F, Tesei B, Cuteri V (2007). Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic *Streptococci* in horses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30(4): 247–60.

Laviolette M, Carreau M, Coulombe R, (1988). Bronchoalveolar lavage cell differential on microscope glass cover: a simple and accurate technique. *Am Rev Respir Dis*, 138(2): 451-7.

Leclerc M, Desnoyers M, Beuchamp G, Lavoie JP (2006). Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Int Med*, 20(2): 377-81.

Léguillette R (2003). Recurrent airway obstruction--heaves. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 19(1): 63-86.

Mair TS, Stokes CR, Bourne FJ (1987). Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Vet J*, 19(5): 458-62.

Mansmann RA, Knight HD (1972). Transtracheal aspiration in the horse. *J Am Vet Med Assoc*, 160(11): 1527-9.

Marlin DJ (2003). Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. In: Robinson NE (ed). *Current Therapy in equine Medicine*. 5th ed, Saunders Co, Philadelphia, USA, pp. 429-33.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P (1993a). Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of equine lung. *Res Vet Sci*, 55(1): 57-9.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P (1993b). Evaluation of urea and albumen as endogenous markers of dilution of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Res Vet Sci*, 55(1): 52-6.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993c). Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J*, 25(4): 261-7.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE (1993d). Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after "natural (hay and straw) challenges". *Vet Immunol Immunopathol*, 363(3): 207-22.

McGorum BC, Dixon PM (1994). The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine Vet Educ*, 6(4): 203-9.

McGorum BC (2007). Equine respiratory Medicine and Surgery. Saunders Co, Philadelphia, USA, pp 125-31.

Mc Kane SA, Rose RJ (1993). Radiographic determination of the location of a blindly passed bronchoalveolar lavage catheter. Equine Vet Educ, 5(6): 329-32.

McKane SA, Canfield PJ, Rose RJ (1993). Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. Aust Vet J, 70(11): 401-4.

Michelotto Jr PV, Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EW, Fernandes LC, Nishiyama A (2010). Platelet-activating factor and evidence of oxidative stress in the bronchoalveolar fluid of Thoroughbred colts during race training. J Vet Intern Med, 24(2): 414-9.

Michelotto Jr PV, Lessa DAB, da Silva KM, S Gawlowsk KRi, Fernandes WR (2013). The airway fluid analysis: methods and interpretation for the athletic horse. R Bras Ci Vet, 20(1): 1-5.

Mordelet-Dambrine M, Arnoux A, Stanislas-leguern G, Sandron D, Chrétien J, Huchon G (1984). Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. Am Rev Respir Dis, 130(2): 305-6.

Nicholls R, Pirie RS (2001). Filtration of bronchoalveolar lavage fluid results in the selective loss of cells. In: Proceeding World Equine Airways Soc Symp, pp. 76.

Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002a). Part 3: The effect of time, temperature and fixative on cytological assessment of equine bronchoalveolar lavage fluid. Equine Vet J, 34(3): 297-301.

Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002b). Part 2: Comparison of smear and cytocentrifuged preparations of equine bronchoalveolar lavage fluid. Equine Vet J, 34(3): 292-6.

Pickles K, Pirie RS, Rhind S, Dixon PM, McGorum BC (2002c). Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots of equine bronchoalveolar lavage fluid. *Equine Vet J*, 34(3): 288-91.

Picot R, Das I, Reid L (1978). Pus, deoxyribonucleic acid, and sputum viscosity. *Thorax*, 33: 235-42.

Pietra M, Guglielmini C, Forni M, Cinotti S (1998). In vitro mucolytic activity of recombinant human deoxyribonuclease on equine tracheobronchial mucus. In: *Proceedings of the World Equine Airways Symposium*, p 30.

Raidal SL, Love DN, Bailey GD, Rose RJ (2000). The effect of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL-derived lymphocytes. *Res Vet Sci*, 68(3): 249-53.

Ramzan PH, Parkin TD, Shepherd MC (2008). Lower respiratory tract disease in Thoroughbred racehorses: analysis of endoscopic data from a UK training yard. *Equine Vet J*, 40(1): 7-13.

Riley CB, Bolton JR, Mills JN, Thomas JB (1992). Cryptococcosis in seven horses. *Aust Vet J*, 69(6): 135-9.

Robinson NE (2001). International workshop on equine chronic airways disease Michigan State University 16-18 June 2002. *Equine Vet J*, 33(1): 5-19.

Robinson NE, Karmaus W, Holcombe SJ, Carr EA, Derksen FJ (2006). Airway inflammation in Michigan pleasure horses: prevalence and risk factors. *Equine Vet J*, 38(4): 293-9.

Rogers DF (2003). The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(1): 1-6.

Rossier Y, Sweeny Cr, Ziemer El (1991). Bronchoalveolar lavage fluid cytologic findings in horses with pneumonia or pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc*, 198(6): 1001-4.

Roy MF, Lavoie JP (2003). Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. Vet Clin North Am Equine Pract, 19(1): 1-17.

Rush B, Mair T (2004). Equine respiratory diseases. Blackwell science Ltd, Blackwell Publishing Co, Oxford, UK.

Sad EP, de Alencar NX, Viscardi V, Costa MF de M, Hess TM, Lessa DAB (2013). Cytology profile and age influence in the equine bronchoalveolar lavage in healthy and asymptomatic inflammatory airway disease. Cienc. Rural, 43(3): 452-455.

Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bitterman PB, Crystal RG(1984). Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. Am Rev Respir Dis, 130(4) :650-8.

Schatzmann U, Straub R, Gerber H (1972). Bronchialsekretaspiration beim Pferd [Transtracheal aspiration in the horse]. Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde, 114: 395-403.

Schatzmann U, Buergi H, Straub R (1973) Der Einfluss von Bisolvon auf das tracheobronchiale Sekret des chronisch lungenkranken Pferdes [The influence of Bisolvon on tracheobronchial secretions of horses with chronic lung disease]. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 80: 97-100.

Shih CK, Litt M, Khan MA, Wolf DP (1977). Effect of nondialyzable solids concentration and viscoelasticity on ciliary transport of tracheal mucus. Am Rev Respir Dis, 115: 989-95.

Sgorbini M, Marchetti V, Stefani C, Corazza M (2010). Results obtained from half in a population of athletic horses. Ippologia 2010, 21(1): 11-8.

Slater JD (2003). Strangles, bastard strangles, vives and glanders: archaeological relics in a genomic age. Equine Vet J, 35(2): 118-20.

Sweeney CR, Beech J, Roby KA (1985). Bacterial isolates from tracheobronchial aspirates of healthy horses. *Am J Vet Res*, 46(12): 2562-65.

Sweeney CR (1989). Tracheal mucus transport rate in healthy horses. *Am J Vet Res*, 50(12) :2135-7.

Sweeney CR (1991). Exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 7(1): 93-104.

Sweeney CR, Beech J (1991). Bronchoalveolar lavage. In Beech J(ed), *Equine Respiratory Disorders*. Lea e Febiger, Philadelphia, USA, pp. 55-61.

Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg S (1992). Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res*, 53(8): 1376-9.

Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg SR (1994). Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *Am J Vet Res*, 55(11): 1501-4.

Taylor FGR, Hillyer MH, (1997). Respiratory diseases. In Taylor FGR, Hillyer MH (eds): *Diagnostic techniques in equine medicine*. WB Saunders Company Ltd, Philadelphia, USA, pp. 215-24.

Tremblay 1993 Tremblay GM, Ferland C, Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP, Cormier Y (1993). Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J*, 25(3): 194-7.

Tomkiewicz RP, App EM, Zayas JG, Ramirez O, Church N, Boucher RC, Knowles MR, King M (1993). Amiloride inhalation therapy in cystic fibrosis. Influence on ion content, hydration, and rheology of sputum. *Am Rev Respir Dis*, 148: 1002-7.

Turgut K, Sasse HH (1989). Influence of clenbuterol on mucociliary transport in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Rec*, 125(21): 526-30.

Vasconcellos C, Allen P, Wohl M, Drazen J, Janmey P, Stossel T (1994). Reduction in viscosity of cystic fibrosis sputum in vitro by gelsolin. *Science*, 263: 969-971.

Viel L. (1980). Structural-functional correlations of the lung in the normal light horse. MSc thesis University of Guelph Ontario, Canada.

Viel L, Hewson J, Staempfli H, Parsons D, Baird J, Smart N, Prescott J (1999). Bacterial isolates from TA and BAL fluid using guarded or non-guarded endoscopy in racehorses. In: *Proceedings Comp Resp Soc Symp*.

Viel L, Hewson J (2003). Bronchoalveolar lavage. In Robinson NE (Ed): *Current Therapy in Equine Medicine* 5th ed .Saunders Co, Philadelphia, USA, pp- 407-11.

Whitwell KE e Greet TR (1984). Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine Vet J*, 16(6): 499-508.

Zinkl JD (2002). Lower respiratory tract. In Cowell RD e Tyler RD (eds): *Diagnostic cytology and hematology of the horse*. 2nd Ed. Mosby, St. Luis, USA pp. 73-86.

Willcox M, Kervitsky A, Watterns LC, et al (1988). Quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. Comparison of cytocentrifuge preparations with the filter method . *Am Rev Respir Dis*, 138(1): 74-80.

Willoughby RA, Ecker GL, McKee SL, Riddolls LJ (1991). Use of scintigraphy for the determination of mucociliary clearance rates in normal, sedated, diseased and exercised horses. *Can J Vet Res*, 55(4): 315–320.

RINGRAZIAMENTI

Il ringraziamento più spontaneo è rivolto alla mia famiglia. Grazie a mio padre, mio fratello, mia sorella, e in particolare a mia mamma, che è sempre presente in ogni momento della mia vita per confrontare e condividere qualsiasi tipo di emozione, compresa quella universitaria.

Un grazie ai miei zii, Elio e Silvana, e a miei cugini, soprattutto a te, Titta, non presente fisicamente, ma, vicino ovunque io sia. Ogni mia gioia è sempre dedicata a te, non vedo l'ora di poterti riabbracciare!!

Ringrazio mia nonna, che è stata la mia seconda mamma, guida premurosa per ogni nipote, con la dolce ossessione, tipica delle nonne meridionali, di sapere se hai mangiato nonostante la tua oltre maggiore età.

Un grazie a Micaela, la mia “capa”, che in tre anni di turno mi ha trasmesso la passione per la medicina equina; ha sempre creduto nelle mie capacità, disponibile, cordiale, e nonostante i tanti chilometri di distanza per la stesura di questa tesi, passo dopo passo mi ha seguito e siamo riusciti a completare il lavoro al meglio.

Ringrazio Francesca, dottoranda eccezionale, che è stata sempre capace di chiarire le tante mie perplessità in ambito veterinario, rassicurandomi e affiancandomi tutte le volte che ce n'era bisogno, e compagna di piacevoli serate San Pieresi.

Ringrazio la grande famiglia dei “cavallari”: grazie a Desiree, Daniele, Costanza, Michela, Giulia, Luca, Laura, Claudia, Vanessa, Margot, Tommi, Marialuisa, Silvia, Chiara, Mirko, Ciccio, Cinzia, Lorenzo, Margherita, Matteo, Martina, Gaia, Maria, Anna; grazie per aver condiviso la passione che ci lega in maniera del tutto naturale e organizzando in ogni momento adeguato favolose cene.

Un grazie speciale è rivolto a Fede, Carlotta, Robi e Manu, più che semplici colleghi, Amici. Negli ultimi anni universitari abbiamo praticamente condiviso tutto, battute, momenti tristi, sorrisi, e soprattutto le nostre fantastiche feste; tutto ciò che può rendere speciale una giornata dopo faticose ore di studio. Grazie per tutto ciò che avete fatto per me, disposti ad aiutarmi e in particolar modo sempre presenti. Sono sicuro che dopo la fine di questo percorso tutto rimarrà uguale.

Ringrazio Alessia e Jacopo, amici di meravigliosi viaggi in camper dal Lazio al Veneto. Per aver studiato insieme esami, tra pause caffè e risate. Grazie per aver reso la vita pisana indimenticabile.

Grazie ai mitici compagni di corso: Andrea, Federica, Alessandra, Francesco, Lorenzo, Mattia, Irene, Aurora, Eleonora, Flavia, Elena, Lucrezia, Celeste, Eleonora e Andrea. E in particolare a Silvia, con cui ho condiviso svariati tirocini, soprattutto il più temuto, ispezione, grazie per aver contribuito a rendere divertente anche qualcosa di noioso e Julieta, con le nostre tante paranoie preesame, superate alla grande e con cui condividerò il medesimo giorno di laurea.

Ringrazio i fantastici amici di una vita: grazie a Salvo, Paolo, Gabriella, Tommaso, Fernando, Ruggero, Martina, Turi e Claudio. Nonostante siamo sparsi in tutta Italia

al rientro nella nostra amata Sicilia, durante i periodi di vacanza, ritorniamo ad essere i soliti amici che giocano e condividono le stesse passioni.

Grazie ai nuovi amici che l'erasmus mi ha permesso di incontrare, grazie a Valdo, Carla, Jette, Helen, Morgane, Sebastian e Annukka. Tra di noi è sempre prevalso lo spirito di gruppo e la condivisione di culture, ricette e usanze molto diverse tra di loro. Grazie per l'aiuto a superare il mio più grande ostacolo, la lingua inglese, durante i fantastici tre mesi trascorsi ad Helsinki.

Grazie soprattutto a Giulia, che nell'ultimo anno di università è stato il mio punto di riferimento per qualsiasi problema e con cui ho condiviso delusioni e importanti traguardi. Grazie per essere sempre disponibile in qualsiasi momento ad ogni mia richiesta, incoraggiandomi e sostenendomi per ogni scelta che ho fatto. Grazie!